

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. K.-W. Jauch

**Immunmodulatorische Wirkungen von
gerinnungsaktiven Substanzen auf die LPS-induzierte
Zytokinsynthese von Monozyten**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Magdalena Schreyer

aus
München

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr.med. Eugen Faist
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Josef Briegel Priv. Doz. Dr. Michael Fiegl
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr.rer.biol.hum. S. Zedler Dr.med. H. Trentzsch
Dekan:	Prof. Dr.med. Dr.h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	28.02.2011

1	EINLEITUNG	1
1.1	Inflammation und Blutgerinnung	1
1.2	Entgleisungen des Gerinnungs- und Immunsystems	2
1.3	Einsatz von gerinnungsaktiven Substanzen in der Intensivmedizin	6
1.3.1	Antikoagulation in der Sepsistherapie	6
1.3.1.1	Aktiviertes Protein C	6
1.3.1.2	Antithrombin III	7
1.3.2	Aktivierter Faktor VII als „rescue-therapy“ bei hämorrhagischem Schock nach schwerem Trauma	8
2	GRUNDLAGEN: DAS GERINNUNGSSYSTEM	11
2.1	Faktor VII als Anfangspunkt der Gerinnungskaskade	11
2.2	Antithrombin III und aktiviertes Protein C als wichtigste, körpereigene antikoagulatorische Substanzen	13
3	GRUNDLAGEN: DAS IMMUNSYSTEM	15
3.1	Das humane Immunsystem	15
3.2	Die zelluläre Immunantwort	15
3.3	Monozyten	16
3.4	Stimulation mit Lipopolysaccharid als Sepsismodell	16
3.5	Zytokine	17
3.5.1	Allgemein	17
3.5.2	Interleukin 1 β	17
3.5.3	Interleukin 6	18
3.5.4	Interleukin 8	19
3.5.5	Interleukin 10	19
3.5.6	Interleukin 12	20
3.5.7	Tumornekrosefaktor α	20
4	ZIELSETZUNG	21
5	MATERIAL UND METHODEN	23
5.1	Geräte und Material	23
5.1.1	Geräte	23
5.1.2	Chemikalien und Lösungen	24
5.2	Methoden	25
5.2.1	Zellkultur	25
5.2.2	Mycoplasmentest	26
5.2.3	Durchflusszytometrie	26
5.2.3.1	Prinzip	26
5.2.3.2	Oberflächenfärbung	27

5.2.3.3	Intrazelluläre Zytokinbestimmung	28
5.2.4	Bioplexmessungen	29
5.2.4.1	Prinzip	29
5.2.4.2	Durchführung	31
5.2.5	Transfektion	31
5.2.5.1	Herstellung des Konstrukts und Transfektion	31
5.2.5.2	Selektion	32
5.2.5.3	Überprüfung der Transfektanten	35
5.2.6	Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und humanen Monozyten	35
5.2.7	Tissue factor Aktivitätsmessung	36
5.2.8	Bestimmung der Thrombinaktivität	37
5.2.9	Statistische Auswertung	37

6 ERGEBNISSE 39

6.1	Optimierung der intrazellulären Zytokinmessung	39
6.1.1	Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration	39
6.1.2	Optimierung der Sekretionsinhibition	39
6.1.3	Optimierung der Stimulation mit LPS	40
6.1.4	Aushungern der Zellen	43
6.2	Einfluss von aktiviertem Protein C auf die LPS induzierte Zytokinantwort von MonoMac6 Zellen	43
6.2.1	Festlegung der Versuchsabläufe	43
6.2.2	Versuche mit serumhaltigem Stimulationsmedium	44
6.2.2.1	Durchflusszytometrie	44
6.2.2.2	Bioplexmessungen	46
6.2.3	Versuche mit serumfreiem Stimulationsmedium	49
6.2.3.1	Durchflusszytometrie	49
6.2.3.2	Bioplexmessungen	50
6.3	Einfluss von Antithrombin III auf die LPS induzierte Zytokinantwort von MonoMac6 Zellen	53
6.3.1	Festlegung der Versuchsabläufe	53
6.3.2	Effekt von Antithrombin	53
6.3.2.1	Durchflusszytometrie	53
6.3.2.2	Bioplexmessungen	55
6.3.3	Effekt von Heparin	58
6.3.3.1	Durchflusszytometrie	58
6.3.3.2	Bioplexmessungen	60
6.3.4	Effekt der Kombination aus Antithrombin und Heparin	62
6.3.4.1	Durchflusszytometrie	62
6.3.4.2	Bioplexmessungen	64
6.4	Einfluss von aktiviertem Faktor VII auf die LPS induzierte Zytokinantwort von MonoMac6 Zellen	67
6.4.1	Festlegung der Versuchsabläufe	67
6.4.2	Ergebnisse des Standardversuchsaufbaus	67
6.4.2.1	Durchflusszytometrie	67
6.4.2.2	Bioplexmessungen	69
6.5	Wird der immunmodulatorische Effekt von aktiviertem Faktor VII auf MonoMac6 Zellen durch tissue factor vermittelt?	71
6.5.1	Oberflächenexpression von tissue factor unter Einfluss verschiedener Stimuli	71
6.5.2	Festlegung weiterer Versuchsabläufe	73
6.5.3	Ergebnisse der Versuche mit vorbehandelten Zellen	75
6.5.3.1	Präinkubation mit LPS	75
6.5.3.2	Vorbehandlung mit TNF α	77
6.5.3.2.1	Durchflusszytometrie	77

6.5.3.2.2	Bioplexmessungen	79
6.5.3.3	Vorbehandlung mit LPS	81
6.5.4	Versuche mit transfizierten Zellen	83
6.5.4.1	Überprüfung der Transfektion	83
6.5.4.1.1	Western Blot	83
6.5.4.1.2	Tissue factor-Aktivität und Oberflächenexpression von MonoMac6 Zellen und TF-transfizierten Zellen	84
6.5.4.1.3	Überprüfung der Stimulierbarkeit	85
6.5.4.2	Effekt von rekombinantem, aktiviertem Faktor VII auf TF-transfizierte Zellen	87
6.5.4.2.1	Durchflusszytometrie	87
6.5.4.2.2	Bioplexmessungen	89
6.6	Ist der beobachtete immunmodulatorische Effekt von rekombinantem, aktiviertem Faktor VII eine thrombinabhängige Wirkung?	91
6.6.1	Effekt von Thrombin	91
6.6.1.1	Durchflusszytometrie	91
6.6.1.2	Bioplexmessungen	93
6.6.2	Bestimmung der Thrombinaktivität im Medium	95
6.7	Effekt von rekombinantem, aktiviertem Faktor VII auf periphere humane Blutzellen und Frage nach klinischer Relevanz	96
6.7.1	Einfluss von rekombinantem, aktiviertem Faktor VII auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion von PBMCs	96
6.7.2	Tissue factor-Aktivität von peripheren Monozyten intensivmedizinisch-behandelter Patienten	99
7	DISKUSSION	101
7.1	Wahl der Messmethode	101
7.2	Aktiviertes Protein C	101
7.3	Antithrombin III	105
7.4	Aktivierter Faktor VII	108
8	ZUSAMMENFASSUNG	117
9	SUMMARY	121
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	125
11	TABELLENVERZEICHNIS	127
12	LITERATURVERZEICHNIS	129
13	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	137
14	DANKSAGUNG	139

1 Einleitung

1.1 Inflammation und Blutgerinnung

Das humane Immunsystem sowie das Blutgerinnungssystem stellen empfindliche Gleichgewichte dar, die eng miteinander verknüpft sind. Auf Infektionen oder Gewebsverletzungen reagiert der menschliche Körper mit einer Aktivierung des Immunsystems, um die Störung des Gleichgewichts zu kontrollieren. Die initiale Abwehrreaktion erfolgt durch das angeborene Immunsystem. Dabei werden die zellulären Komponenten dieses Systems aktiviert, und eine Vielzahl von Zytokinen und anderen Mediatoren wird ausgeschüttet. Die klassischen zytokinproduzierenden Zellen des angeborenen Immunsystems sind Monozyten oder Makrophagen, die unter anderem den Prototyp der proinflammatorischen Zytokine, Tumornekrosefaktor α (TNF α), sezernieren. TNF α spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr einer lokalen Entzündung oder Infektion, indem es z.B. neutrophile Granulozyten und mononukleäre Phagozyten aktiviert. Wird es jedoch systemisch freigesetzt, kann eine Ereigniskaskade ausgelöst werden, die zu Gewebeschäden, Organdysfunktion und Tod führen kann.[1]

Die Aktivierung der Gerinnung ist wichtiger Bestandteil der Abwehr von Krankheitserregern, dadurch soll die Ausbreitung der Infektion eingedämmt werden.[2] Bereits vor 30 Jahren wurden Veränderungen des Blutgerinnungssystems als Reaktion auf Entzündungen beschrieben.[3] Mittlerweile ist gängige Meinung, dass während einer Sepsis die systemische Entzündung unweigerlich zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems und einer gleichzeitigen Inhibition des blutgerinnungshemmenden Systems sowie der Fibrinolyse führt.[4] Dies kann zur Entstehung von Mikrothromben, zu Gewebeunterversorgung und letztendlich zu Organversagen führen.[5] Inflammatorische Zytokine sind die Hauptmediatoren der entzündungsvermittelten Gerinnung, da sie unter anderem die Plättchenproduktion und -empfindlichkeit erhöhen.[6] Der wichtigste Verknüpfungspunkt zwischen Gerinnung und Inflammation scheint jedoch der Oberflächenrezeptor Gewebethromboplastin (engl.: tissue factor, TF) zu sein, der zusammen mit Faktor (F) VII den Anfangspunkt der exogenen Gerinnungskaskade bildet. Gewebethromboplastin kommt normalerweise nur auf Zellen vor, die nicht in direktem Kontakt mit Blut stehen, oder eine Barriere zwischen Gewebe und Blut darstellen. Es wird aber, unter anderem, durch Bakterientoxin im Zirkulationssystem induziert, zum Beispiel auf Monozyten und Makrophagen. Unter pathologischen Bedingungen wie Entzündung

oder Gefäßverletzung könnte der exogene Weg somit als induzierbare Koagulation verstanden werden, wobei die vermehrte Expression von TF im Wesentlichen als initiales Gerinnungssignal dient.[7] Inzwischen geht man aber auch davon aus, dass Bestandteile des Koagulationssystems in der Lage sind, die Immunantwort zu beeinflussen.[8] Beispielsweise führte die Aktivierung der Gerinnung durch intravenöse Gabe von rekombinantem, aktiviertem FVII (rFVIIa) zur Freisetzung von Interleukin (IL)-6 und IL-8 im Plasma gesunder Probanden.[9]

1.2 Entgleisungen des Gerinnungs- und Immunsystems

Gerade die Entgleisung der beiden Systeme, Gerinnung und Inflammation, steht in engem Zusammenhang.

Eine Entzündung ist in der Regel ein lokales Ereignis mit den Kardinalsymptomen Rötung, Überwärmung, Schmerz und Schwellung. Eine akute Entzündung ist normalerweise auf Stunden bis wenige Tage begrenzt und nach heutigem Verständnis in erster Linie durch Vasodilatation, Flüssigkeitsaustritt ins Gewebe und Leukozyteninfiltration charakterisiert. Vasodilatation manifestiert sich klinisch durch Rötung und Hitze, sie soll den lokalen Transport von löslichen Mediatoren und Zellen ermöglichen. Die entzündliche Gefäßerweiterung wird vor allem von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandinen verursacht. Gleichzeitig ist die Permeabilität der die Entzündung umgebenden physiologischen Barrieren stark erhöht, wodurch ein Flüssigkeits- und Proteineinstrom ins Interstitium entsteht. Dieses sogenannte „capillary leakage“ ermöglicht den Übertritt von löslichen Botenstoffen und Antikörpern ins entzündete Gewebe, stellt aber gleichzeitig auch eine Schrankenstörung dar. Diese entzündliche Ödembildung imponiert klinisch als Schwellung. Bei starker, systemischer Entzündung kann die Gefäßerweiterung zu systemischer Hypotonie und septischem Schock führen.[10]

Die drei Charakteristika einer Entzündung, Vasodilatation, Flüssigkeitsaustritt ins Gewebe und Leukozyteninfiltration, sind Teile der angeborenen Immunantwort. Deren Stärke wird zu einem großen Teil durch die Aktivität von Zytokinen bestimmt. Normalerweise steht die Immunantwort unter ständiger Kontrolle, beseitigt die Entzündung und unterstützt die Reparatur des geschädigten Gewebes. Auch die Produktion der Zytokine ist unter normalen Umständen selbstlimitierend, und es besteht stets ein Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Peptiden. Kommt es jedoch zu einer unkontrollierten Immunreaktion, die als Ursache für septisches Organversagen angenommen wird, kann sowohl eine exzessive Inflammation als auch Immunsuppression

zum Tod des Patienten führen.[11] Die Kriterien einer systemischen Entzündungsreaktion wurden 1991 in einer Konsensus-Konferenz des „American College of Chest Physicians“ und der „Society of Critical Care Medicine“ unter dem Begriff „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) zusammengefasst und wie folgt definiert (siehe Tabelle 1).[12]

Mindestens zwei der folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

• Körpertemperatur	>38°C oder <36°C	
• Herzfrequenz	>90 Schläge/min	
• Atemfrequenz	>20Züge/min	oder
PaCO ₂	<32mm Hg	
• Leukozyten	>12.000/mm ³ oder <4.000/ mm ³	oder
Unreife Leukozytenformen	>10% (Linksverschiebung)	

Tabelle 1: Definition des SIRS

Ist eine Infektion Ursache des SIRS, spricht man von einer Sepsis. Eine schwere Sepsis liegt vor, wenn sich aufgrund der Erkrankungsschwere Organfunktionsstörungen feststellen lassen. Tritt in diesem Zusammenhang ein Versagen des cardio-vaskulären Systems auf, spricht man vom sog. septischen Schock, der nosologisch eine eigene Entität darstellt. Dieser liegt vor, wenn zusätzlich ein systolischer arterieller Blutdruck unter 90mm Hg oder ein mittlerer arterieller Blutdruck unter 65mm Hg für mindestens eine Stunde auftritt.[13] Die Steigerung der schweren Sepsis mit Dysfunktion von mindestens zwei Organsystemen definiert das septische Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS).

Neben viralen oder bakteriellen Infektionen gibt es eine Vielzahl von Faktoren, die ein SIRS verursachen können, so zum Beispiel akute Pankreatitis, Traumata, Verbrennungen, Ischämie, hämorrhagischer Schock oder Gewebsverletzungen in Folge großer operativer Eingriffe.[14] Auch eine intravenöse Gabe von proinflammatorischen Zytokinen kann zu einem MODS oder SIRS ähnlichen Syndrom führen.[15] Das legt nahe, dass das klinische Syndrom der Sepsis nicht ausschließlich durch direkte Einwirkung mikrobieller Produkte zu Stande kommt, sondern auch durch die Wirkung körpereigener Mediatoren erklärbar ist.[16] Man kann den septischen Schock sogar als schwere Zytokin-induzierte pathologische Konsequenz einer Entzündungsreaktion betrachten.[17]

Die aus diesen klinischen Beobachtungen abgeleiteten Paradigmen gingen bisher davon aus, dass nach dem ersten Stimulus (Trauma, Sepsis, Schock) zuerst eine kurze proinflammatorische SIRS-Phase auftritt. Darauf folgt eine längere antiinflammatorische

Phase, die als „compensatory anti-inflammatory response syndrome“ (CARS) bezeichnet werden kann.[17] Dieses Syndrom ist durch eine beeinträchtigte Antigenpräsentation, eine Paralyse der Makrophagen, T-Zell-Anergie, eine verminderte T_H1 -Proliferation und eine erhöhte Apoptoserate der B- und T-Lymphozyten charakterisiert.[18] Biochemische Veränderungen während des CARS beinhalten erhöhte Konzentrationen von IL-10 und von löslichen Gegenspielern von IL-1 und TNF, sowie eine verminderte Oberflächenexpression von Humanem Leukozytenantigen-DR (HLA-DR) auf peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC). Vor allem nach schweren Traumen oder Verbrennungen tritt diese Immunsuppression häufig auf. Dabei reflektierten in einer Untersuchung von Neidhardt et al. hohe IL-10 Plasmaspiegel den Schweregrad der Verletzung und korrelierten mit dem Risiko schwere septische Komplikationen zu entwickeln.[19] Durch die überschießende Immunreaktion der ersten Phase, kann es zu einem frühen Organversagen kommen. Gleichzeitig macht die nachfolgende Immunsuppression den Körper angreifbarer für nosokomiale Infektionen und andere Komplikationen. Dadurch kann es zu einem zweiten Aufblühen der Immunantwort und zu einem späten Organversagen kommen. Die Übergänge zwischen SIRS und CARS sind fließend. Das Nebeneinander von pro- und antiinflammatorischer Überregulation wird deshalb von einigen Autoren als „mixed anti-inflammatory response syndrome“ (MARS) bezeichnet. [17] Der Ablauf dieses Modells der Immunantwort nach septischem Insult ist in Abbildung 1 bildlich dargestellt.

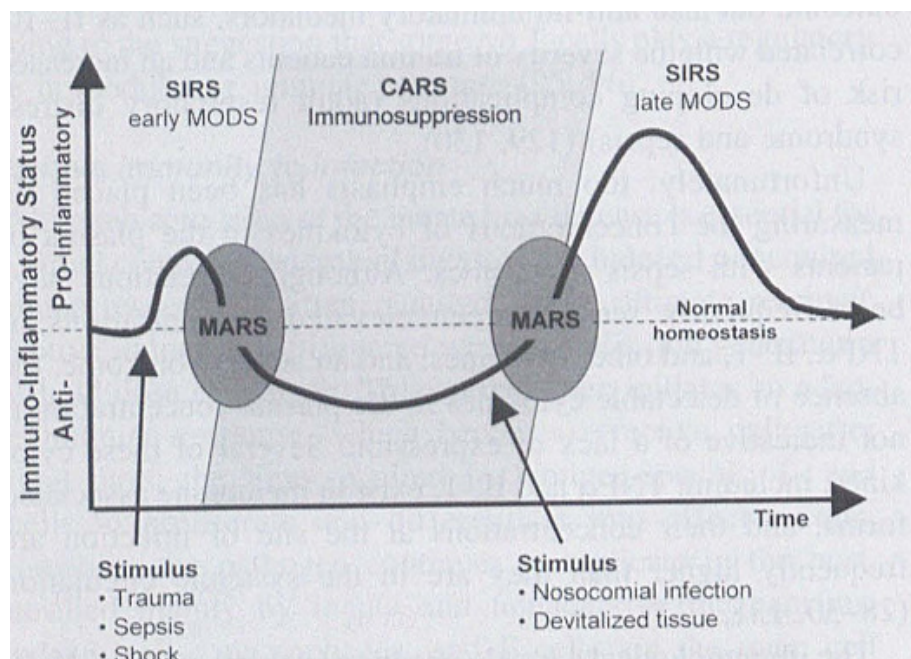


Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf der Immunantwort nach septischem Insult (Abbildung aus [17])

Nach heutigem Verständnis laufen die beiden Phasen der Immunreaktion jedoch eher gleichzeitig als zeitlich versetzt ab. Die Antiinflammation wäre dann der benötigte Gegenspieler zur Proinflammation, um eine Verschiebung des Gleichgewichts ins Extreme zu verhindern. In einem murinen Sepsismodell wurden beispielsweise erhöhte Plasmaspiegel für pro- und antiinflammatorische Mediatoren zu identischen Zeitpunkten gemessen. Entgegen der Annahme, dass auf eine proinflammatorische Phase eine antiinflammatorische folgt, waren beide Arten von Mediatoren nur mit frühen Todesfällen in den Tagen 1-5 nach Auslösen der Sepsis assoziierbar, aber nicht mit spätem septischen Organversagen.[20]

Während der beschriebenen Immunreaktion kommt es unweigerlich auch zur Aktivierung des Gerinnungssystems. Die während einer systemischen Entzündung entstehenden Zytokine, speziell $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 , aktivieren die Blutgerinnung, unter anderem wahrscheinlich durch die Induktion von TF auf Endothelzellen und Monozyten, und vermindern die Fibrinolyse.[21, 22] Dies führt zur Ablagerung von Fibrin und somit zu einer Behinderung des Blutflusses, was fortschreitendes Organversagen durch Gewebeunterversorgung zur Folge haben kann. Durch die massive Aktivierung des Gerinnungssystems kommt es zum Verbrauch von sowohl pro- als auch antikoagulatorisch aktiven Proteinen. Neben mikrovaskulären Thrombosen kann es also gleichzeitig zu diffusen Blutungen kommen.[23] In Abbildung 2 ist dieses als disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) bezeichnete Ungleichgewicht zwischen intravasaler Fibrinablagerung und –entfernung schematisch dargestellt.

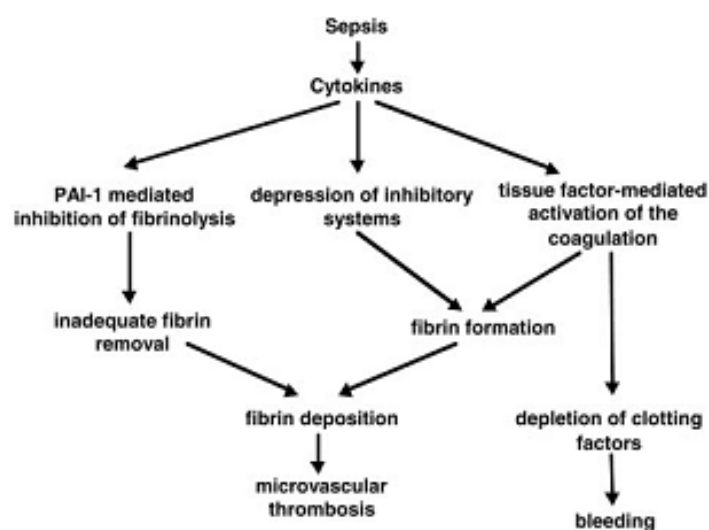


Abbildung 2: Ungleichgewicht des Gerinnungssystems in der Sepsis (Abbildung aus [23]) (PAI-1=Plasminogen activator inhibitor-1)

1.3 Einsatz von gerinnungsaktiven Substanzen in der Intensivmedizin

1.3.1 Antikoagulation in der Sepsistherapie

Das Hauptproblem der Gerinnungsaktivierung während der Sepsis ist die Bildung von mikrovaskulären Thromben aufgrund starker Fibrinbildung und unzureichender Fibrinolyse. Durch die massive Aktivierung der Gerinnung kommt es zu einer sogenannten Verbrauchskoagulopathie, bei der vor allem die antikoagulatorische Kapazität stark reduziert ist. So ist die Aktivität von Antithrombin III (ATIII) und aktiviertem Protein C (APC), zwei der wichtigsten körpereigenen Gerinnungsinhibitoren, während der Sepsis erheblich vermindert.[24, 25] Die Wiederherstellung des antikoagulatorischen Systems stellt somit einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Therapie des septischen Multiorganversagens dar.

1.3.1.1 Aktiviertes Protein C

Rekombinant hergestelltes aktiviertes Protein C (Drotrecogin Alpha) hat als Xigris® seit 2002 die europäische Zulassung zur Behandlung der schweren Sepsis. In der PROWESS-Studie (Recombinant human activated protein C worldwide evaluation on severe sepsis), eine klinische Studie der Phase 3, wurde eine Reduktion der 28-Tage Letalität durch die Gabe von APC bei Patienten mit schwerer Sepsis festgestellt.[26] Mehr als 85% der Patienten mit schwerer Sepsis haben ein niedriges Protein C Level, zudem ist die Umwandlung in die aktivierte Form in der Sepsis gestört. Die niedrigen Protein C Level korrelieren mit Sterblichkeit und Morbidität der Patienten, unabhängig von Alter, beteiligtem Erreger, Vorhandensein von Schock, DIC, Grad der Hyperkoagulation oder Schweregrad der Krankheit.[27] Bei Patienten mit Sepsis und niedrigem Sterberisiko, oder bei Kindern mit Sepsis wurde jedoch noch kein klarer Vorteil durch die Gabe von APC festgestellt, da die positiven Auswirkungen immer einem erhöhten Blutungsrisiko gegenüber stehen.[28] Im Tiermodell verhinderte die Gabe von APC den Tod durch normalerweise letale Endotoxindosen. Dabei war die APC-Infusion mit einer verminderten Konzentration an Entzündungsmarkern assoziiert.[29] Wurde hingegen die endogene Aktivierung von Protein C blockiert, reagierten die Tiere auf eine niedrige Dosis *E.coli* als hätten sie eine toxische Menge erhalten.[30] In einer Studie mit Patienten mit niedrigem Endotoxinplasmaspiegel zeigte sich jedoch nach Gabe von APC oder Placebo kein Unterschied in den Entzündungsmarkern.[31]

Neben der antikoagulatorischen Wirkung von APC und der damit verbundenen Wiederherstellung des Gleichgewichts im Blutgerinnungssystem zeigt APC auch davon unabhängige zytoprotektive Effekte.[32] Dazu gehören die Veränderung von Genexpressionsprofilen, antiinflammatorische und anti-apoptotische Aktivität sowie die Stabilisierung der Endothelbarriere.[33] So wurde in einem humanen Modell für Endotoxin-induzierte pulmonale Entzündung nach Gabe von APC eine verminderte Akkumulation von Neutrophilen in den Atemwegen nachgewiesen. Ex vivo konnte zusätzlich eine verminderte Endotoxin-induzierte Chemotaxis der Neutrophilen festgestellt werden.[34] In vitro ließ sich eine Inhibition der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und daraus resultierend, eine verminderte Lipopolysaccharid(LPS)-induzierte Produktion von TNFα, nachweisen.[35] Neben Veröffentlichungen, die eine massive Veränderung der Monozyten Funktion durch APC in vitro postulieren, unter anderem eine verminderte LPS-induzierte Produktion von TNFα, IL-1β, IL-6 und IL-8[36], gibt es auch ex vivo Studien, die keine Veränderung der Endotoxin-stimulierten Zytokinproduktion von Monozyten zeigen.[37]

1.3.1.2 Antithrombin III

Im Gegensatz zu APC zeigte ATIII in einer großen Phase 3 Studie (KyberSept-Trial) an Patienten mit schwerer Sepsis keine Reduktion der 28-Tage Letalität.[38] In Tiermodellen für Sepsis konnte jedoch mehrmals eine verminderte Sterblichkeit und ein reduziertes Auftreten von Organdysfunktion durch ATIII festgestellt werden.[39-42] Bei Patienten mit Sepsis verkürzte die ATIII-Gabe mit dem Ziel einer Plasmaaktivität über 100% die Dauer der DIC.[43, 44] Unter kontinuierlicher Zufuhr von ATIII mit dem Ziel einer Plasmaaktivität von über 120% konnte die Verbesserung von Organfunktionen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe demonstriert werden.[45] In einer Metaanalyse des KyberSept-Trials wurde die Auswirkung der Hochdosis-ATIII-Therapie auf die Letalität von Patienten mit schwerer Sepsis und einem hohen Risiko zu sterben ausgewertet. Dabei konnte eine verminderte 56- und 90-Tage Sterblichkeit nachgewiesen werden. All diese Effekte waren in der Patientensubgruppe, die kein Heparin erhielt, deutlicher ausgeprägt.[46] Bereits im KyberSept-Trial wurde eine Störung des ATIII-Effekts durch die gleichzeitige Gabe von Heparin vermutet.

Auch ATIII hat, wie APC, von seinen antikoagulatorischen Eigenschaften unabhängige antiinflammatorische Effekte.[47] So gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen, die eine reduzierte Leukozyten-Endothel-Wechselwirkung durch ATIII beschreiben. Durch diese

Beeinträchtigung wurde der Flüssigkeitsaustritt aus den Gefäßen, die Störung der Mikrozirkulation und die Schädigung der Organe signifikant reduziert[48, 49], hierbei schien die durch ATIII stimulierte Ausschüttung von Prostacyclin durch Endothelzellen eine entscheidende Rolle zu spielen.[50] Souter et al. zeigten, dass ATIII die LPS-induzierte Expression von IL-6 und TF durch mononukleäre Zellen vermindert.[51] Oelschläger et al. konnten nachweisen, dass neben diesen beiden Molekülen auch TNF α durch die Blockade von NF κ B durch ATIII in seiner Produktion gemindert wird.[52] Die Reduktion der IL-1 β Synthese ließ sich bis jetzt nur in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur nachweisen.[53] Im Tiermodell konnten Minnema et al. eine Verbesserung der Überlebensrate von Pavianen durch ATIII nach einer letalen *E.coli*-Gabe feststellen, dabei waren die Plasmalevel im Vergleich zur reinen *E.coli*-Gruppe für IL-6 und IL-8 erhöht, für TNF α und IL-10 jedoch nach ATIII-Gabe erniedrigt.[42]

1.3.2 Aktivierter Faktor VII als „rescue-therapy“ bei hämorrhagischem Schock nach schwerem Trauma

Rekombinanter, aktivierter Faktor VII ist zur Behandlung und Prophylaxe von Blutungen bei Patienten mit angeborener Blutgerinnungsstörung zugelassen. Seit einigen Jahren wird er aber auch als „rescue therapy“ zur Kontrolle schwerer traumatisch verursachter Hämorrhagien propagiert.[54] Dabei soll durch die Gabe von rFVIIa die Koagulation spezifisch am Ort der Verletzung verstärkt werden, indem es die exogene Gerinnung aktiviert und zu einer massiven Thrombin-Produktion führt.[55] Die Ergebnisse einer randomisierten, placebokontrollierten Studie über die Verwendung von rFVIIa zur Blutungskontrolle nach stumpfem Trauma zeigten, bei vermindertem Transfusionsbedarf in der rFVIIa-Behandlungsgruppe, eine verminderte Inzidenz für das acute respiratory distress syndrome (ARDS) und Multiorganversagen. Gleichzeitig wurde keine Erhöhung nachteiliger Effekte, wie Thromboembolien oder systemische Koagulation festgestellt.[56] In einer retrospektiven Studie konnten Rizoli et al. bei Traumapatienten mit massiven Blutungen eine Verbesserung der Überlebensrate in den ersten 24 Stunden feststellen.[57] In einer anderen retrospektiven Studie über rFVIIa als Zusatztherapie bei der Behandlung von vaskulären Verletzungen in Kriegszeiten erwies sich rFVIIa als effektive Komponente zur Blutungskontrolle und zur Umkehr der Koagulopathie. Die Letalität der Patienten blieb aber in der rFVIIa-Gruppe unverändert gegenüber der Kontrollgruppe.[58] Eine placebokontrollierte, klinische Studie zur Untersuchung der Effektivität und Sicherheit von rFVIIa als Blutungskontrolle bei stumpfem und penetrierendem Trauma wurde 2008

aufgrund einer zu geringen Sterblichkeit in der gesamten Studienpopulation vorzeitig abgebrochen.[59] Dabei ergab sich zwar ein verminderter Transfusionsbedarf in der rFVIIa Therapiegruppe, aber kein Unterschied bezüglich Sterblichkeit und Morbidität im Vergleich zu Placebo.[60] Es gibt bisher noch keine randomisierte, kontrollierte Studie, die eine Verbesserung des Überlebens von Traumapatienten durch die Gabe von rFVIIa beweist. Deshalb wird empfohlen, die Anwendung von rFVIIa auf Extremsituationen zu beschränken, entweder als Zusatztherapie oder wenn konventionelle Maßnahmen nicht anschlagen.[55]

Die intravenöse Gabe von rFVIIa führte bei gesunden Probanden ohne weiteren Stimulus zur Freisetzung von IL-8 und IL-6, was durch die Bildung von Thrombin erklärt wurde.[9] Für Thrombin wurde unter anderem eine Erhöhung der LPS-induzierten TNF α - und IL-1 β -Synthese durch Monozyten[61] sowie eine Erhöhung der IL-10-, IL-6- und IL-1 β -Produktion in PBMCs nachgewiesen.[62-64]. Neben der möglichen Beeinflussung der Zytokinantwort durch die Freisetzung von Thrombin geht man zusätzlich davon aus, dass FVIIa einen direkten immunmodulatorischen Einfluss auf Makrophagen hat. Es wurden erhöhte Syntheseraten für IL-6 und IL-8 und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies beobachtet.[65, 66] TF scheint dabei nicht nur als Aktivator und Rezeptor für FVII in der Gerinnungskaskade von Bedeutung zu sein, sondern auch als Vermittler für die Wirkungen von FVIIa auf die Zelle.[67] Auf Monozyten und Makrophagen wird TF normalerweise nur geringfügig exprimiert, ist aber durch verschiedene Stimuli, unter anderem LPS oder TNF α , induzierbar.[7]

2 Grundlagen: Das Gerinnungssystem

2.1 Faktor VII als Anfangspunkt der Gerinnungskaskade

Früher wurde das Hämostasesystem in den extrinsischen und intrinsischen Weg unterteilt, mittlerweile wird letzterer als endogener Weg bezeichnet, der aber in vivo kaum von Bedeutung ist.[14] Das extrinsische, mittlerweile als exogenes System bezeichnete Gerinnungssystem, ist das für in-vivo-Vorgänge interessantere System, da es durch Gewebsverletzung aktiviert wird. Durch die Verletzung wird TF freigelegt, der in verschiedenen extravaskulären Geweben auftritt und nun in Kontakt mit im Blut zirkulierendem FVII kommt, der dadurch zu FVIIa aktiviert wird. Der Komplex aus FVIIa und TF aktiviert wiederum FX und FIX. Faktor FXa sorgt durch proteolytische Spaltung von Prothrombin für die Bildung von Thrombin. Bereits kleine Mengen von Thrombin aktivieren nun FV und FVIII. FVIIIa bildet einen Tenase-Komplex mit FIXa, welcher ein starker Aktivator für FX ist. FVa dient als Cofaktor für FXa, wodurch nun große Mengen Thrombin entstehen. Als zusätzliche Amplifikation aktiviert Thrombin FXI, welcher wiederum FIX aktiviert.

Thrombin aktiviert außerdem Thrombozyten, die FV freisetzen und eine optimale Oberfläche bieten, um große Thrombinmengen entstehen zu lassen, da sie Ca^{2+} und Phospholipide tragen. Erst im Komplex mit diesen Komponenten entfalten die Gerinnungsfaktoren ihre volle Wirkung. Durch Thrombin wird Fibrinogen in Fibrinmonomere umgewandelt und zusätzlich FXIII aktiviert, welcher die Fibrinpolymerisation auslöst. In Abbildung 3 ist diese Gerinnungskaskade bildlich dargestellt.

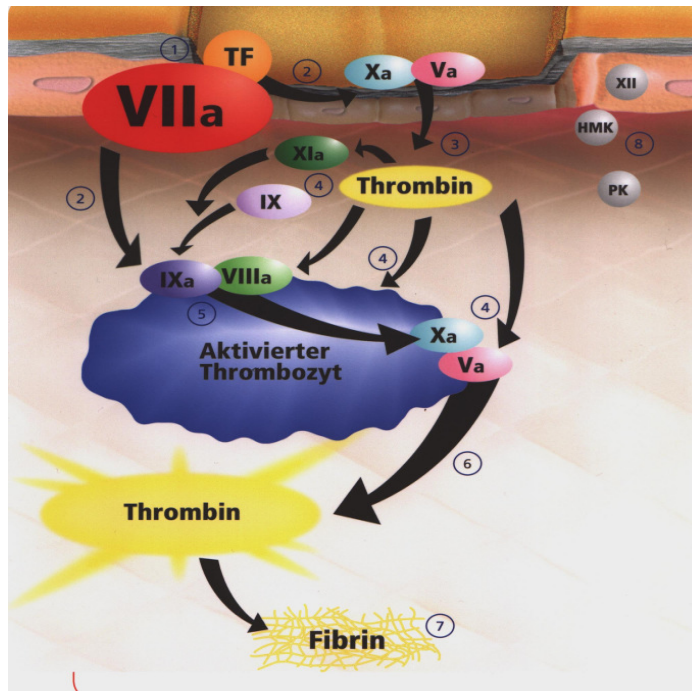


Abbildung 3: FVIIa als Anfangspunkt der Gerinnungskaskade (Abbildung der Firma NovoNordisk)

Unter pathologischen Bedingungen wie SIRS oder Sepsis wird vermutlich TF, induziert durch Endotoxin oder Zytokine, auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen und aktivierten Monozyten und Makrophagen exprimiert, wodurch eine unkontrollierte systemische Gerinnungsaktivierung ausgelöst werden kann.[5] .

In pharmakologischer Konzentration aktiviert rFVIIa jedoch vermutlich direkt, also unabhängig von TF, FX auf der Oberfläche von Monozyten. (Information der Firma NovoNordisk)

Die Initiation der exogenen Gerinnungskaskade wird durch Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) unter Kontrolle gehalten. Er bildet einen quartären Komplex mit TF, FVIIa und FXa, und hemmt so die Bildung von Thrombin aus Prothrombin.[5]

Direkte Wirkungen des TF-FVIIa-Komplexes auf die Zellfunktion werden vermutlich über die proteolytische Aktivierung des Protease-aktivierten-Rezeptors- (PAR-) 2 vermittelt. Zusätzlich kann der Komplex aus TF, FVIIa und FXa wahrscheinlich PAR-1 aktivieren, welcher auch durch das in der Gerinnungskaskade generierte Thrombin gespalten werden kann. Es ist noch unklar, ob noch weitere Oberflächenrezeptoren oder noch unbekannte PAR-Moleküle an der TF-FVIIa Signaltransduktion beteiligt sind.[67]

2.2 Antithrombin III und aktiviertes Protein C als wichtigste, körpereigene antikoagulatorische Substanzen

Neben TFPI sind APC und ATIII die beiden wichtigsten körpereigenen Antikoagulantien. ATIII beeinflusst die Aktivität einer ganzen Anzahl von Gerinnungsfaktoren, es hemmt Thrombin, FIXa, FXa, FXIa und FXIIa durch Komplexbildung.[68] Unter Heparineinfluss ist die Wechselwirkung zwischen ATIII und den Gerinnungsfaktoren mindestens um das Tausendfache erhöht. Heparin bindet an ATIII, welches dadurch eine Konformationsänderung erfährt, wodurch die Fähigkeit zur Inhibition der Gerinnungsfaktoren zunimmt. Heparinähnliche Glycosaminoglykane (GAGs) an der Endotheloberfläche können die verstärkende Wirkung von Heparin übernehmen. Auch ohne Heparin inhibiert ATIII die Gerinnungskaskade sehr effektiv, lediglich deutlich langsamer. Somit kann ATIII als ein Modulator der physiologischen Reaktion gesehen werden, der Zeit für Wundheilung lässt, aber eine systemische Aktivierung der Hämostase verhindert.[47]

Die antiinflammatorische Wirkung von ATIII scheint über die Bindung von ATIII an GAGs auf der Zelloberfläche vermittelt zu werden. Syndecan-4, ein Heparansulfatproteoglykan, ist ein wichtiger zellulärer Rezeptor für ATIII.[69] Heparin und GAGs auf der Zelloberfläche konkurrieren um ein und dieselbe ATIII-Bindungsstelle, was eine Blockade der antiinflammatorischen Wirkung von ATIII durch Heparin bedeuten könnte.[47]

APC inhibiert, mit Protein S als Cofaktor, FVa und FVIIIa irreversibel durch Proteolyse.[68] Die Aktivierung von Protein C erfolgt durch einen Komplex aus Thrombin und Thrombomodulin. Steigt die Thrombinkonzentration, so bindet ein Großteil des Thrombins an Thrombomodulin, welches sich hauptsächlich an der Endotheloberfläche befindet, was zur Aktivierung von Protein C führt. Der endotheliale Protein-C-Rezeptor (EPCR) vervielfacht die Aktivierungsrate in vivo ungefähr um das zwanzigfache, indem er Protein C bindet und es dem Thrombin-Thrombomodulin-Aktivierungskomplex präsentiert. Sobald die Thrombinentstehung nachlässt, hört der Aktivierungskomplex auf APC zu generieren. APC agiert also in einem negativen Feedbackmechanismus, der auf die vorhandene Thrombinmenge reagiert.[30]

Neben seiner antikoagulatorischen Aktivität besitzt APC auch eine davon unabhängige antiinflammatorische Wirkung. Diese wird vermutlich über die Bindung von APC an EPCR und die nachfolgende proteolytische Spaltung von PAR-1 vermittelt.[70]

3 Grundlagen: Das Immunsystem

3.1 Das humane Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor schädlichen Einflüssen jeder Art. Es existiert eine Vielzahl von Mechanismen, um diese Bedrohungen zu erkennen, Informationen darüber zu vermitteln und sie zu bekämpfen. Man unterscheidet dabei zwischen der unspezifischen Immunabwehr, die schon sehr früh in der Phylogenese entstanden und angeboren ist, und der spezifischen Immunabwehr, die erst im Laufe des Lebens eines Organismus entsteht. Zur unspezifischen Abwehr gehören neben den physiologischen Barrieren, wie Epithelien und Schleimhäute, unter anderem auch die klassische Entzündungsreaktion und die Abwehr durch Fresszellen. Gelingt es einem Krankheitserreger, die Epithelbarriere zu überwinden, werden sie von Immunzellen der unspezifischen Immunabwehr, wie Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten, z.B. durch Phagozytose bekämpft. Gleichzeitig wird durch sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) eine entzündliche Immunantwort ausgelöst. Die hierbei freigesetzten Zytokine haben neben einer Vielzahl von lokalen Effekten auch signifikante Fernwirkungen. Unter anderem locken sie weitere Immunzellen an und aktivieren das spezifische Immunsystem. Auch durch Phagozytose kann die spezifische Immunabwehr aktiviert werden, indem aufgenommenes Fremdeiweiß auf der Zelloberfläche als Antigen präsentiert wird. Diese nicht angeborene, spezifische Abwehr ist ein lernfähiges System. Es ist in der Lage spezifische Antikörper gegen Antigene von Mikroorganismen zu entwickeln.

3.2 Die zelluläre Immunantwort

Neben der Einteilung in unspezifische und spezifische Immunabwehr kann auch nach zellulärer und humoraler Antwort unterschieden werden. Humorale Bestandteile des Immunsystems sind das Komplementsystem, Lysozym, Interferone, Akut-Phase-Proteine und spezifische Antikörper. Dem gegenüber steht die zelluläre Immunantwort, deren Zellen aus pluripotenten Stammzellen entstehen, die sich anschließend entweder in myeloische oder lymphatische Stammzellen differenzieren. Aus letzteren entstehen B- und T-Lymphozyten sowie Natürliche Killerzellen. Granulozyten und Monozyten entstehen aus myeloischen Vorläuferzellen. T-Lymphozyten sind in der Lage, die ihnen über die als major histocompatibility complex- (MHC-) bezeichneten Moleküle präsentierten Antigene

zur erkennen. Während körpereigene Antigene toleriert werden, lösen körperfremde Antigene die spezifische T-Zell-vermittelte zelluläre Immunantwort aus. B-Lymphozyten sind ebenfalls in der Lage Antigene zu erkennen und können nach Stimulation durch Lymphokine, die durch aktivierte T-Zellen ausgeschüttet werden, zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren. Differenzierte B- und T-Zellen, die aus der klonalen Expansion nach einem Kontakt mit körperfremdem Antigen hervorgehen, können diese Information immunologisch im Wirtsorganismus konservieren. Man spricht von Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt eine spezifische Immunantwort auslösen.

Die unspezifische zelluläre Immunabwehr erfolgt über Granulozyten, Natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen. Die sogenannten antigenpräsentierenden Zellen, dazu gehören Monozyten und dendritische Zellen, sind in der Regel die ersten Bestandteile des Immunsystems, die einen eindringenden Krankheitserreger bekämpfen.

3.3 Monozyten

Im Knochenmark werden unter Einfluss des Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) oder des Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (M-CSF) aus der myeloischen Stammzelle Monoblasten gebildet. Aus diesen entwickeln sich Monozyten, die aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf übergehen. Mit 5-20µm Durchmesser gehören sie zu den größten Leukozyten und besitzen einen großen bohnenförmigen Kern und wenig Zytoplasma. Bei Kontakt mit Infektionen wandern sie ins Gewebe ein und differenzieren zu Makrophagen. Auf der einen Seite interagieren sie mit T-Zellen durch Antigen-Präsentation über den MHC-Komplex, auf der anderen Seite können sie mit Hilfe von Oberflächenrezeptoren vom Toll-like-Typ PAMPs erkennen und eine Immunantwort auslösen. Ein gut untersuchtes Beispiel ist der Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4), der zusammen mit dem CD-14 Rezeptor die Induktion der Entzündungsantwort auf LPS in das Zellinnere vermittelt. Infolgedessen werden inflammatorische Zytokine, unter anderem IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α , ausgeschüttet.

3.4 Stimulation mit Lipopolysaccharid als Sepsismodell

Lipopolysaccharid ist ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien. Es ist aus drei Teilen zusammengesetzt, einer Lipidkomponente, die beim Zerfall der Bakterien als Endotoxin wirkt, einer Kernregion und einer Polysaccharidkomponente. Eine Injektion von

LPS führt bei gesunden Probanden zu einer akuten Entzündungsreaktion.[71] Zur Aktivierung von Säugetierzellen durch LPS ist eine Serie von Interaktionen mit verschiedenen Proteinen nötig. LPS bindet zuerst an das lösliche LPS-Bindungsprotein (LBP), dieser Komplex bindet anschließend an den Oberflächenrezeptor CD14 auf Monozyten. CD14 transferiert LPS auf einen Komplex aus MD-2 und TLR-4, wodurch eine Signalkaskade ins Zellinnere ausgelöst wird. Diese Kaskade führt zur Aktivierung von NFκB und löst eine Abwehrreaktion des angeborenen Immunsystems aus. Das klinische Bild der gramnegativen Sepsis ist maßgeblich auf diese Signaltransduktion zurückzuführen,[72, 73] was die Stimulation mit LPS als Sepsismodell verwendbar macht.

3.5 Zytokine

3.5.1 Allgemein

Zytokine sind Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 15-25kDa. Sie werden von verschiedenen Zelltypen nach Kontakt mit geeigneten Noxen schnell synthetisiert und sezerniert. Durch Bindung an spezifische Rezeptoren können sie immunologische Reaktionen auslösen. Sie können sowohl autokrin als auch parakrin auf verschiedene Zellarten wirken. Zytokine vermitteln ihre Wirkung meist durch eine Veränderung der Genexpression der Zielzelle und induzieren dadurch möglicherweise Differenzierung, Proliferation, Migration oder Apoptose der Zelle. Außerdem kann die Synthese weiterer Zytokine hervorgerufen oder deren Wirkung beeinflusst werden.[74] Zytokine können nach ihrer biologischen Funktion in Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine eingeteilt werden. Im Folgenden werden die wichtigsten von Monozyten produzierten Zytokine genauer betrachtet.

3.5.2 Interleukin 1β

Interleukin 1β ist eines der ersten Zytokine, das von Monozyten als Reaktion auf eine Noxe freigesetzt wird. Zusammen mit TNFα und IL-6 gehört es zu den klassischen proinflammatorischen Zytokinen und endogenen Pyrogenen. Es führt zur Aktivierung des Gefäßendothels, wodurch Adhäsionsmoleküle wie E-Selectin an der Endotheloberfläche exprimiert werden, was von zentraler Bedeutung für das Einwandern von Leukozyten ins entzündete Gewebe ist. Darüber hinaus aktiviert und mobilisiert es Lymphozyten und neutrophile Granulozyten. Zu den weiteren endogenen Wirkungen von IL-1β gehört die Induktion von Fieber und die Anregung der Produktion von Proteinen der akuten Phase in

der Leber, welche zur Aktivierung der Komplementkaskade führen. Neben Monozyten produzieren unter anderem auch Endothelzellen und Fibroblasten IL-1 β .

IL-1 ist ein Polypeptid mit 17,5kDa und kommt in zwei Isoformen vor (IL-1 α und IL-1 β), die sich in ihren biologischen Wirkungen kaum unterscheiden. Es wird zuerst als 31kDa Vorläuferprotein gebildet und im Zytosol gehalten. Die Produktion erfolgt nach Stimulation von Toll-like Rezeptoren, z.B. von TLR-4 durch LPS. In speziellen, sekretorischen Lysosomen kommt das Präkursorprotein mit dem Interleukin-1 converting enzyme (=Caspase1) in Kontakt und wird in seine aktive Form umgewandelt. Anschließend wird es auf einem nicht-klassischen Weg sezerniert. Sowohl die Aktivierung, als auch die Sekretion von IL-1 β sind reguliert, d.h. nicht alle produzierten Vorläuferproteine erscheinen als aktive Form in der Zirkulation.[75]

IL-1 β vermittelt seine Wirkung über den IL-1 Rezeptor-Typ I, der eine Signalkaskade auslöst, die zur Freisetzung von NF κ B im Zytosol und zu dessen Translokation in den Zellkern führt. Es bindet an enhancer-Elemente von Zielgenen und führt so, unter anderem, zur Induktion von IL-6, IL-8 und Prostaglandinen. Die IL-1 Wirkung wird durch einen IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) und durch den IL-1 Rezeptor Typ II reguliert. Ersterer antagonisiert die IL-1 Wirkung, letzterer fängt das Zytokin ein, ohne eine Wirkung zu vermitteln.

3.5.3 Interleukin 6

Interleukin 6 gehört zu den klassischen proinflammatorischen Zytokinen. Monozyten sowie B- und T-Lymphozyten produzieren IL-6. Neben gemeinsamen Wirkungen mit IL-1 β , wie die Aktivierung der Produktion von Akut-Phase-Proteinen und der Induktion von Fieber, spielt IL-6 eine wichtige Rolle in der Einleitung der spezifischen Immunabwehr. Durch den Einfluss von IL-6 werden die als erstes am Entzündungsherd eintreffenden neutrophilen Granulozyten durch in das Gewebe einwandernde Monozyten abgelöst und dendritische Zellen aktiviert. Es werden also rein phagozytierende Zellen gegen antigenpräsentierende ausgetauscht. Gleichzeitig werden T-Zellen angelockt und deren Differenzierung und Proliferation induziert. B-Lymphozyten werden zur Produktion von Antikörpern angeregt, deshalb wird IL-6 auch B-Zell-stimulierender Faktor genannt. Zudem hat IL-6 auch antiinflammatorische Wirkungen, beispielsweise wird die Produktion von TNF α und IL-1 β reduziert[76] und die Ausschüttung ihrer Inhibitoren angeregt.[77]

Die Synthese von IL-6 wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor NF κ B induziert. Seine Wirkung vermittelt IL-6 über den membrangebundenen IL-6 Rezeptor.

3.5.4 Interleukin 8

Interleukin 8, oder auch CXCL-8, gehört zur Gruppe der Chemokine. Das sind Moleküle, die eine gerichtete Chemotaxis auslösen, also Zielzellen zum Ursprung des Zytokins locken. IL-8 wurde vor zwanzig Jahren als Prototyp dieser Gruppe entdeckt.[78] Es mobilisiert in erster Linie neutrophile Granulozyten, aber auch T-Lymphozyten. Produziert wird IL-8 von Monozyten, Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten, wenn diese, wie bei IL-6, von Aktivatoren bestimmter Transkriptionsfaktoren, z.B. NFκB, stimuliert werden. IL-1β und TNFα induzieren also die Bildung von IL-8 und IL-6.

Rezeptoren für IL-8 sind CXCR1 und CXCR2, die G-Protein gekoppelt sind, und neben der Erhöhung der Chemotaxis zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Granulozyten und zu deren Aktivierung mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen führen.

3.5.5 Interleukin 10

Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Zytokinen ist IL-10, neben tumor growth factor-β, einer der zwei wichtigsten antiinflammatorisch wirkenden Vertreter dieser Mediatoren. Es wurde früher sogar als Zytokinsynthese-inhibierender Faktor (CSIF) bezeichnet. Es ist in erster Linie für die Eindämmung der Entzündungsreaktion wichtig, die sonst in einem septischen Schock enden könnte. Es blockiert den Transkriptionsfaktor NFκB und somit die Expression von, unter anderem, IL-6, IL-8, IL-12 und TNFα in antigenpräsentierenden Zellen, außerdem wird die Wirkung von IL-1β durch die Bildung von IL-1Ra antagonisiert. Die Proliferation von B-Zellen wird aktiviert und die Funktion von Natürlichen Killerzellen reguliert. Außerdem wird die Differenzierung von T-Helferzellen dahingehend beeinflusst, dass diese einerseits die spezifische humorale Seite der Immunabwehr verstärken und gleichzeitig die Antigenpräsentation von Monozyten und dendritischen Zellen vermindern. Der proinflammatorische Zytokinsturm der Monozyten wird also eingedämmt und gleichzeitig die Beseitigung des inflammatorischen Stimulus betrieben.[79]

Seine Wirkung vermittelt IL-10 über den IL-10 Rezeptor, der, wie die Interferon-Rezeptoren, zu den Klasse II Zytokinrezeptoren gehört, die den JAK-STAT-Signalweg aktivieren.[80]

3.5.6 Interleukin 12

Interleukin 12 wird von dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen bzw. Monozyten als Reaktion auf Bakterien und Viren freigesetzt. Die Aktivierung erfolgt über Toll-like-Rezeptoren. IL-12 aktiviert Natürliche Killerzellen, induziert die Interferon- γ (IFN- γ) Freisetzung und trägt zur Differenzierung von T-Lymphozyten bei, womit es eine Schlüsselfunktion bei der Aktivierung der spezifischen Immunantwort einnimmt.[81]

3.5.7 Tumornekrosefaktor α

Tumornekrosefaktor α gehört neben IL-1, IL-6 und IL-12 zu den typischen proinflammatorischen Zytokinen. Seine Bildung wird unter anderem über die Stimulation von TLR oder NF κ B angeregt. Es wird in erster Linie von Makrophagen synthetisiert, kann aber beispielsweise auch von Lymphozyten oder Endothelzellen produziert werden. Seine lokale Ausschüttung führt zu einer Entzündungsreaktion und zur Eindämmung der Infektion, da es Monozyten mobilisiert und zur Phagozytose anregt, neutrophile Granulozyten anlockt und durch eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwände das Einwandern von Zellen ins Gewebe erleichtert. Zentral wird Fieber ausgelöst und in der Leber die Produktion von Akut-Phase-Proteinen induziert. Wird jedoch bei einer systemischen Entzündung TNF α in den Blutstrom freigesetzt, kann es zur Symptomatik eines septischen Schocks kommen.[82]

Neben den Funktionen in der Entzündungsreaktion hat TNF α auch eine anti-apoptotische Wirkung. Darauf geht der Name Tumor-Nekrose-Faktor zurück, da ein Tumorsterben bei Mäusen nach Behandlung mit TNF α festgestellt wurde.[74]

Über die Bindung an seine membrangebundenen Rezeptoren kann TNF α die Mobilisierung von NF κ B induzieren und so die Transkription inflammatorischer Gene anregen.[83] Außerdem existiert ein löslicher TNF α -Rezeptor, der durch proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne vom Rest des Moleküls entsteht. Er inaktiviert TNF α , indem er das Molekül bindet, aber kein Signal weiterleitet.[84]

4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, einige wichtige Verknüpfungspunkte zwischen Inflammation und Gerinnung näher zu betrachten. Besonders interessant sind dabei Substanzen, die auch therapeutisch eingesetzt werden. Septisches Mehrorganversagen ist die häufigste Todesursache bei chirurgischen Intensivpatienten[85] und gleichzeitig ein Zustand, bei dem Koagulation und Inflammation sehr eng miteinander verknüpft sind. Man geht davon aus, dass das septische Mehrorganversagen durch die Immunantwort des Organismus auf eine Infektion und die daraus resultierende überschießende systemische Freisetzung inflammatorischer Mediatoren vermittelt wird.[86] Den ersten Kontakt zwischen Erregern und Immunsystem stellen in der Regel antigenpräsentierende Zellen dar. Dazu gehören Monozyten, die auch die Hauptproduzenten der entzündlichen Mediatoren sind.

APC und ATIII stellen als gerinnungshemmende Substanzen einen vielversprechenden Therapieansatz in der schweren Sepsis dar, jedoch konnte nur für APC der Nutzen in einer prospektiv-randomisierten klinischen Studie der Phase 3 bewiesen werden.[26] Für beide Substanzen ist der Einfluss auf die Mediatorenfreisetzung von Monozyten noch nicht vollständig geklärt. Im KyberSept-Trial und in einer nachfolgenden Metaanalyse wurde eine Beeinträchtigung der Wirkung von ATIII bei Patienten mit schwerer Sepsis durch die gleichzeitige Gabe von Heparin vermutet.[38, 46] Für rFVIIa konnten Boffard et al. eine Reduktion von ARDS und Multiorganversagen nach stumpfem Trauma zeigen[56], was im Widerspruch zu berichteten proinflammatorischen Wirkungen von rFVIIa steht.[9, 65, 66]

Diese Arbeit soll folgende Fragen beantworten:

1. Haben APC, ATIII und rFVIIa eine gerinnungsunabhängige modulatorische Wirkung auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung von Monozyten?
2. Beeinflusst die Zugabe von Heparin die Wirkung von ATIII im Zellkulturmodell?
3. Wie beeinflusst rFVIIa die Zytokinfreisetzung von CD14+ Monozyten aus PBMCs gesunder Probanden?
4. Ergeben sich unterschiedliche Effekte unter Berücksichtigung der verschiedenen Messmethoden: 1) die durchflusszytometrisch messbare intrazelluläre de-novo-Synthese der Zytokine im Vergleich mit 2) der mit einem Luminex-100-System im Kulturüberstand bestimmten Proteinsekretion der Monozyten?

Zur Bearbeitung der Fragestellung musste zunächst ein geeignetes Zellkultur-Modell etabliert werden, das geeignet ist die inflammatorische Antwort von Immunzellen unabhängig von Einflüssen der Gerinnungskaskade zu untersuchen. Um die Auswirkungen der gerinnungsaktiven Substanzen auf die Zytokinproduktion von Monozyten möglichst isoliert betrachten zu können, wurde ein Versuchsmodell mit einer humanen, monozytären Zelllinie, MonoMac6, etabliert. Zur Simulation einer SIRS oder Sepsis wurde die Stimulation mit LPS verwendet. Bei rFVIIa wurde zusätzlich die Beeinflussung der Zytokinproduktion von CD14+ Monozyten aus PBMCs gesunder Probanden untersucht.

5 Material und Methoden

5.1 Geräte und Material

5.1.1 Geräte

- Durchflusszytometer EPICS XL, Beckman Coulter, Fullerton (CA), USA
- BioPlex System, Bio-Rad, Hercules (CA), USA
- Versamax tunable mp Reader, Molecular Devices, Sunnyvale (CA), USA
- Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg
- Elektrophorese Power Supply, Novex Power Ease 500, Invitrogen, Karlsruhe
- Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg
- SonoPuls HD2070, Bandelin, Berlin
- pH-Meter P501, Consort, Turnhout, Belgien
- Durchlichtmikroskop, Zeiss, Oberkochen
- Zentrifugen: Rotanta 460R und Universal 30F, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
- Begasungsbrutschrank B5060 EC/CO₂, Heraeus, Hanau
- Sicherheitssterilwerkbank, Klasse II, BSB 6, Flow Laboratories, Meckenheim
- Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1mm, 0,0025mm², Optik Labor
- DNA Workstation, UniEquip, Martinsried
- Vortex Mixer VX100, Labnet, Woodbridge (NJ), USA
- Wasserbad Typ MS, MGW LAUDA, Lauda-Königshofen
- Pipetus-Akku, Hirschmann, Eberstadt
- Schlauchpumpe, Verder, Haan
- Pipetten research (0,1-2,5µl, 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl), Eppendorf, Hamburg

5.1.2 Chemikalien und Lösungen

- VLE RPMI (very low endotoxin Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 mit stabilem Glutamin, FG 1415, Biochrom, Berlin
- Penicillin/Streptomycin 10.000I.E./10.0000µg/ml, A2212, Biochrom, Berlin
- Nicht-essentielle-Aminosäuren-Konzentrat, K0293, Biochrom, Berlin
- OPI-Media Supplement, 05003-1VL, Sigma, Hamburg
- Fötale Kälberserum (FCS), FBS Superior S0615, Lot Nr. 0943K, Biochrom, Berlin
- Trypan Blue Solution (0,4%), T8154, Sigma, Hamburg
- Lipopolysaccharid von *E.coli* 0127:B8, L4516-1MG, Sigma, Hamburg
- Brefeldin A von *Penicillium brefeldianum*, 15870, Sigma, Hamburg
- Recombinanter, humaner Tumornekrosefaktor α von *E.coli*, CB1112011, PAN-Biotech, Aidenbach
- Intraprep Permeabilization Reagent, A07803, Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
- Phosphat gepufferte Saline (PBS), pH 7.2, (Natriumchlorid 5,48g, di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat 10,12g, Kaliumdihydrogenphosphat 2,28g, Wasser für Injektionszwecke ad 1000ml), Apotheke Klinikum Innenstadt, München
- Biocoll Separating Solution, L6115, Biochrom, Berlin
- Hanks`s buffered salt solution (HBSS), 24020-091, Invitrogen, Karlsruhe
- Natriumazid, S-2002, Sigma, Hamburg
- Heparin-Natrium Braun 25.000I.E./ml; Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm
- Aktiviertes Protein C, Xigris®, Lilly, Bad Homburg
- Antithrombin III, Kybernin HS500®, ZLB Boehringer, Ingelheim
- rFVIIa, Novo Seven®, NovoNordisk, Mainz
- Actichrome TF Kit, 846, American Diagnostica, Stamford, USA
- Thrombin protein, ab62452, Abcam, Cambridge, UK
- Geneticin, 11811-023, Invitrogen, Karlsruhe
- Zeocin, 45-0430, Invitrogen, Karlsruhe

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur

Die in diesem Modell verwendete Zelllinie MonoMac6 wurde 1988 aus dem peripheren Blut eines Patienten mit monoblastischer Leukämie isoliert. Die Zellen zeigen phänotypisch und funktional die Charakteristika von reifen Monozyten. So exprimieren sie CD14, produzieren reaktive Sauerstoffspezies und sind zur Phagozytose fähig.[87] Leider wurde bei den durchgeführten Versuchen zur Methodenoptimierung festgestellt, dass sie, im Gegensatz zu isolierten, humanen Monozyten, kein IL-6 produzieren, was einen Nachteil dieser Zelllinie darstellt.

Sämtliche Arbeiten mit MonoMac6 Zellen wurden mit sterilem Material auf einer sterilen Werkbank mit laminalem Luftzug durchgeführt. Da diese Zelllinie außerdem sehr empfindlich auf Endotoxin reagiert, wurde ausschließlich pyrogenfreies Material verwendet.[88]

Die Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert:

VLE RPMI 1640 mit stabilem Glutamin
200 I.E./ml Penicillin, 200µg/ml Streptomycin
1x Nicht-essentielle-Aminosäuren
10ml/l OPI-Media Supplement

Diese Mischung wurde zur Entfernung von Endotoxin mit einer 20kD cut off Säule (Ultra Steri Set, Gambro Medizintechnik, Planegg) ultrafiltriert. Zur Überprüfung der Effektivität dieser Filtration wurde das Medium mit einem LAL-Test auf seinen LPS-Gehalt getestet. Dieser Test wurde von der Abteilung Klinische Chemie des Klinikums Großhadern durchgeführt. Die Messung ergab einen LPS-Gehalt von weniger als 0,05 Endotoxin Units (E.U.)/ml. Laut Europäischem Arzneibuch dürfen einem Menschen maximal 5 E.U. pro kg Körpergewicht (KG) pro Stunde verabreicht werden.[89] Das heißt, ein ml des Mediums enthält ein Hundertstel dessen, was einem Menschen pro Stunde und kg KG infundiert werden darf. Das Medium wurde in 200ml Einheiten bei 4°C gelagert und kurz vor Gebrauch mit 10% FCS versetzt. Das FCS wurde vorher bei 56°C für 30min. im Wasserbad hitzeinaktiviert.

Die Zellen wurden in 24well Platten (Firma Nunc, Roskilde, Dänemark), 2ml/well, 2×10^5 Zellen/ml bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die

Zellen mit einer Pipette resuspendiert und geerntet. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 400xg bei 20°C für 7min wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt, und die Zellen in oben genannter Konzentration frisch ausgesät. Um tote Zellen bei der Zählung auszuschließen, wurde mit 0,4% Trypanblau-Lösung gefärbt. Die Zellsuspension enthielt stets mindestens 80% lebende Zellen.

5.2.2 Mycoplasmentest

Um die Zellkultur auf Verunreinigung mit Mycoplasmen zu untersuchen, wurde in regelmäßigen Abständen ein Test mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen drei Tage ohne Antibiotikum kultiviert und anschließend Zellkulturüberstand entnommen. Damit wurde eine „real-time“-PCR mit spezifischen Primern der Firma Metabion, Martinsried durchgeführt. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch bestimmt. Als Positivkontrolle dienten mit Mycoplasmen kontaminierte Zellen, als Negativkontrolle wurde Millipore Wasser verwendet. Der Test war stets negativ.

5.2.3 Durchflusszytometrie

5.2.3.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie (engl.: fluorescence activated cellsorting, FACS) ist ein optisches Verfahren bei dem Partikel, in diesem Fall Zellen, einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Dabei messen Detektoren die Streuung des Laserlichts. Das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht (Vorwärtsstreulicht, engl.: Forward Scatter, FSC) gibt Informationen über die Größe der durch die Durchflusszelle geführten Zelle, das im 90° Winkel gestreute Licht (Seitwärtsstreulicht, engl.: Side Scatter, SSC) lässt Rückschlüsse auf deren innere Struktur zu. Zusätzlich können durch fluorochromierte Antikörper Strukturen auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren detektiert werden. Die zu verwendende Menge des Antikörpers wurde stets in einer vorausgehenden Titration bestimmt, um immer die optimale Konzentration einzusetzen.

In der vorgelegten Arbeit wurde ein EPICS XL Flow Cytometer der Firma Beckman Coulter verwendet. Das Gerät enthält einen 15mW Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488nm. Trifft der Laserstrahl auf einen Fluoreszenzfarbstoff, der über einen Antikörper an ein Antigen in oder auf der Zelle gebunden ist, emittiert dieser Licht einer höheren

Wellenlänge als die des Anregungslasers. Dieses emittierte Licht wird von Photomultiplier Tubes aufgefangen, verstärkt und an die Datenverarbeitung weitergeleitet. Mit dem verwendeten Gerät können vier verschiedene Emissionswellenlängen gemessen werden: 525nm, 575nm, 620nm und 675nm. In dieser Arbeit wurden drei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet: Fluoresceinisothiocyanat (FITC) mit einem Emissionsmaximum von 525nm (grün), Phycoerythrin mit einem Emissionsmaximum von 575nm (orange-rot) und PE-Cy5, ein Tandemkonjugat aus R-Phycoerythrin und Cyan 5 mit einem Emissionsmaximum von 675nm (dunkelrot).

Um Zytokine intrazellulär messen zu können, muss dem Versuchsansatz ein Sekretionsinhibitor zugesetzt werden. Dafür wurde Brefeldin A verwendet, ein aus *Penicillium brefeldianum* gewonnenes Antibiotikum, das den Transport zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi Apparat blockiert. Alternativ kann Monensin eingesetzt werden, ein Antibiotikum aus *Streptomyces cinnamomensis*, das die Sekretion von Proteinen verhindert, indem es den Ionentransport zwischen Zellmembranen unterbricht. Anschließend wird die Zellmembran der Zellen mit Saponin permeabilisiert, sodass fluoreszenzmarkierte Antikörper in die Zelle eindringen und die Zytokine anfärben können.

5.2.3.2 Oberflächenfärbung

Zur Anfärbung von TF auf der Zelloberfläche wurde ein PE-markierter muriner Antikörper gegen humanes TF der Firma BD Pharmingen, San Diego, USA verwendet. 1×10^6 Zellen in 1ml Zellkulturmedium wurden mit 500µl PBS mit 0,1% NaN_3 (PBS/ NaN_3) versetzt, bei 470xg, 4°C für 5min. abzentrifugiert und das Zellpellet in 500µl PBS/ NaN_3 resuspendiert. Davon wurden 50µl in ein 5ml Rundboden-Röhrchen (Firma BD Falcon, Mississauga (ON), Kanada) entnommen und mit 10µl Antikörper versetzt. Nach einer Inkubation von 15min. bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde der überschüssige Antikörper mit 2-3ml PBS/ NaN_3 abgewaschen. Dafür wurde das Röhrchen mit der Waschflüssigkeit zur Hälfte gefüllt, die Zellen bei 300xg, 4°C für 5min. abzentrifugiert und der Überstand abgekippt. Als Negativkontrolle wurde eine Isotypfärbung zum Nachweis unspezifischer Fc-Bindungen nach gleichem Protokoll durchgeführt. Der verwendete Antikörper war ein muriner, PE-markierter Antikörper gegen humanes IgG1 von Beckman Coulter, Marseille, Frankreich.

Bei den in dieser Arbeit ebenfalls verwendeten PBMCs handelt es sich um eine Mischpopulation aus Monozyten und Lymphozyten. Um den Anteil von Monozyten zu

bestimmen, wurde CD14 als Monozytenmarker angefärbt. Dafür wurde ein FITC-konjugierter Antikörper der Firma Beckman Coulter, Marseille, Frankreich verwendet. Die Isotypkontrolle war ein muriner, FITC-konjugierter Antikörper gegen humanes IgG2a von Beckman Coulter, Marseille, Frankreich. 50µl Zellsuspension mit 1×10^6 PBMCs/ml wurden mit 5µl Antikörper versetzt und 20min bei 4°C inkubiert. Die Probe wurde wie oben beschrieben einmal gewaschen und am Durchflusszytometer gemessen.

5.2.3.3 Intrazelluläre Zytokinbestimmung

Zur Anfärbung der nach LPS-Stimulation produzierten Zytokine im Zellinneren wurden folgende Antikörper verwendet: Antikörper gegen humanes IL-8 (PE-konjugiert, Firma Diaclone, Besancon, Frankreich); gegen humanes IL-1β (FITC-konjugiert, Firma eBioscience, Frankfurt); gegen humanes TNFα (PE-konjugiert, Firma eBioscience, Frankfurt); gegen humanes IL-6 (FITC-konjugiert, Firma eBioscience, Frankfurt)

Die Stimulation der Zellen und die anschließende Färbung wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Einstellen der Zellen auf 1×10^6 Zellen/ml; aussäen mit 1ml pro well auf einer 24well Platte im Fall von MonoMac6 Zellen, 1ml Zellsuspension in einem Zellkulturröhrchen im Fall von PBMCs; die Röhrchen wurden im Brutschrank in eine rotierende Lochscheibe gesetzt, um eine bessere Durchmischung zu erreichen und eine Adhäsion der Zellen zu verhindern; MonoMac6 Zellen sind Suspensionszellen, die keine adäquate Reaktion auf LPS ergeben, wenn sie während der Stimulation bewegt werden
2. Zugabe von Brefeldin (10µg/ml), APC, ATIII oder rFVIIa in den angegebenen Konzentrationen und LPS (200ng-1000ng/ml) zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten
3. Inkubation bei 37°C/5% CO₂
4. Zellen resuspendieren, ernten und in 1,5ml Eppendorfgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführen
5. 1x waschen: mit 500µl PBS/NaN₃ auffüllen, bei 200xg/4°C, 5min zentrifugieren, Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abziehen
6. 1x waschen: Zellpellet in 1ml PBS/NaN₃ aufnehmen und wie unter 5. behandeln

7. Anfärbung von CD14 als Monozytenmarker an der Zelloberfläche (nur im Fall von PBMCs nötig): Zugabe von 10µl CD14-PC5 (Firma Beckman Coulter), kurz vortexen und 20min. bei 4°C inkubieren
8. Fixieren der Zellen mit 100µl Fixierungslösung (Intraprep Permeabilization Reagent); sofort nach der Zugabe 10sec. vortexen, dann 15min bei Raumtemperatur inkubieren, dabei alle 3min. vortexen
9. 1x waschen (siehe 6.)
10. Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen mit 300µl 20% AB-Serum in PBS/NaN₃, mit einer Pipette resuspendieren, 30min bei 4°C inkubieren
11. 1x waschen (siehe 6.)
12. Permeabilisieren der Zellen mit 100µl Permeabilisierungslösung (Intraprep Permeabilization Reagent); mit einer Pipette resuspendieren, 10min. bei Raumtemperatur inkubieren
13. 30µl der permeabilisierten Zellen in ein 5ml Rundbogenröhrchen überführen
14. Anfärben der intrazellulär fixierten Zytokine mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (IL-1β: 1µl; IL-6: 0,5µl; IL-8: 10µl; TNFα: 2µl); kurz vortexen, 20min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
15. 1x waschen: Röhrchen mit PBS/NaN₃ zur Hälfte auffüllen, bei 300xg, 4°C für 5min. zentrifugieren, Überstand abkippen
16. Messung der Zytokine, am Durchflusszytometer: IL-1β, IL-8 und TNFα bei MonoMac6 Zellen; IL-1β, IL-6, IL-8 und TNFα bei PBMCs

Als Negativkontrolle diente eine unstimulierte Probe mit zugegebenen Antikörpern.

5.2.4 Bioplexmessungen

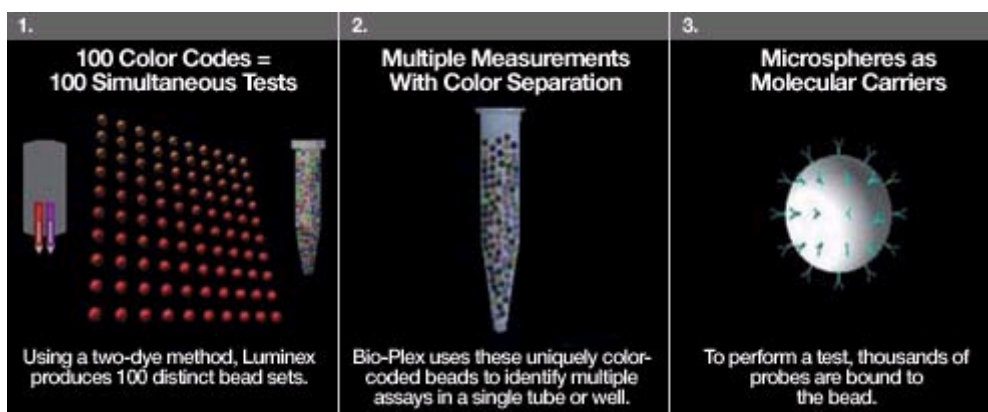
5.2.4.1 Prinzip

Neben der semiquantitativen intrazellulären Messung der Zytokinsynthese, wurden auch quantitative Bestimmungen der sezernierten Zytokinmengen von TNFα, IL-1β, IL-8 und IL-10 durchgeführt. Diese Bestimmungen erfolgten mit einem BioPlex Cytokine Assay von BioRad.

Das BioPlex System ist ein Sandwich Immunassay, der mit Polystyren Mikropartikeln als feste Phase arbeitet. Dieses Prinzip ist unter dem Namen Luminex 100 System bekannt. Die Partikel sind mit einer Mischung aus rot- und infrarot-fluoreszierenden Farbstoffen

gefärbt. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der beiden Farbstoffe entstehen hundert verschiedene farbcodierte Mikropartikelarten. An deren Oberfläche sind spezifische, monoklonale Antikörper gekoppelt, die mit einem bestimmten Protein, z.B. einem Zytokin, in der zu messenden Probe reagieren. Aufgrund der Farbkodierung kann jeder Mikropartikel entsprechend einen anderen spezifischen Antikörper tragen.

Werden diese Mikropartikel in eine Probe gegeben, erhält man Polystyrenkügelchen, an die unterschiedliche Mengen des zu bestimmenden Proteins gebunden sind. Zu dieser Mischung wird ein biotynlierter Detektionsantikörper gegeben, der mit einem anderen Epitop des Proteins reagiert, als der Erste. So entsteht ein Sandwich von Antikörpern um das gebundene Protein. Zuletzt wird Streptavidin-Phycoerythrin zugegeben, das an den biotynlierten Antikörper bindet und mit PE einen Fluoreszenzfarbstoff bietet, mit dem die Menge an gebundenem Protein quantifiziert werden kann. Die so behandelte Probe wird in den Assay Reader gesaugt und in einem Durchflusszytometer von zwei verschiedenen Lasern bestrahlt. Ein Laser mit 635nm regt die Fluoreszenzfarbstoffe der Mikropartikel an, so kann unterschieden werden, welches Protein gemessen wird. Der zweite Laser regt mit 532nm das PE an, so dass die Menge an gebundenem Protein pro Mikropartikel berechnet werden kann. Anhand von Standardkurven, die mit rekombinantem Protein erstellt werden, kann die Konzentration von bis zu 100 verschiedenen Proteinen gleichzeitig bestimmt werden. In Abbildung 4 ist die Methode bildlich dargestellt.



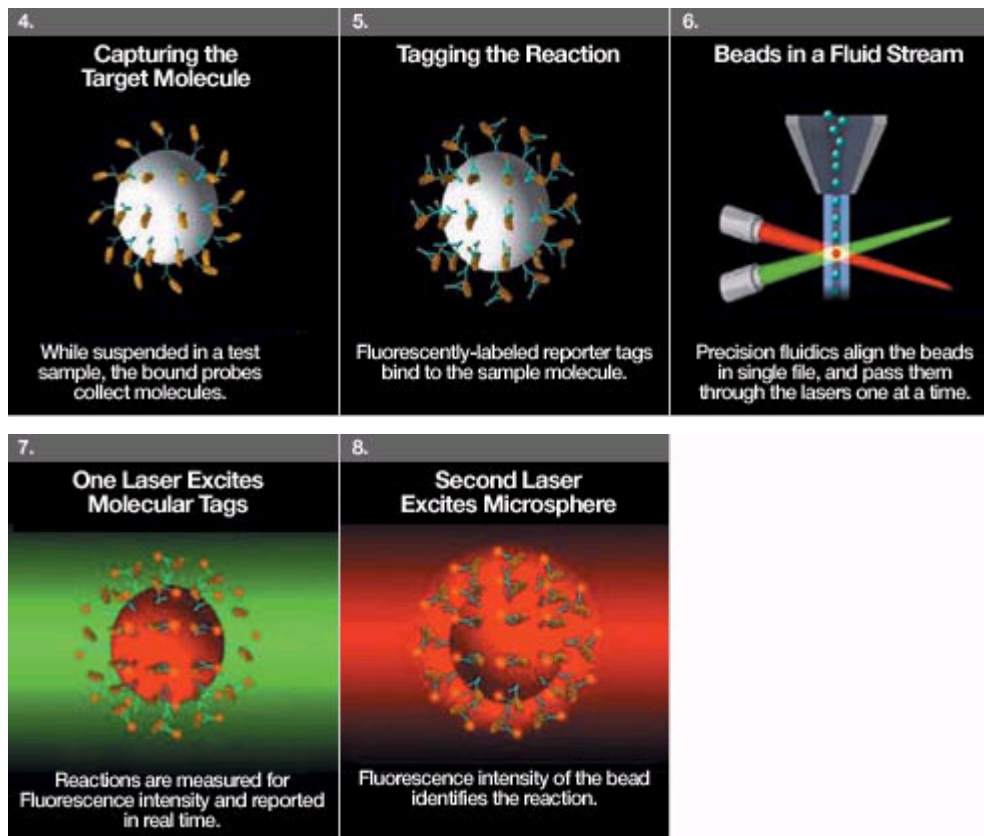


Abbildung 4: Bildliche Darstellung der Bioplexmethode (Abbildung der Firma Biorad)

5.2.4.2 Durchführung

MonoMac6 Zellen wurden zu 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und mit der zu untersuchenden gerinnungsaktiven Substanz versetzt. Nach einer Stunde Präinkubation wurde LPS in einer Konzentration von 200-1000ng/ml zugegeben und für weitere 23 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand nach einem Zentrifugationsschritt mit einer Pipette abgenommen, aliquotiert und bis zur Messung bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung der einzelnen Zytokine, IL-1 β , IL-8, IL-10 und TNF α , erfolgte nach Angaben des Herstellers aus dem abgenommenen Zellkulturüberstand. Bei serumfreien Proben wurde vor der Messung 1% FCS als Trägerprotein zugefügt.

5.2.5 Transfektion

5.2.5.1 Herstellung des Konstrukts und Transfektion

Da TF auf MonoMac6 Zellen durch LPS induzierbar ist (vgl.6.5.1), wurden zur Gewinnung der TF-mRNA 1×10^6 MonoMac6 Zellen in 1ml Medium in 24well Platten ausgesät und vier Stunden bei 37°C im Brutschrank mit 200ng/ml LPS inkubiert.

Anschließend wurde mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen, Hilden die Gesamt-RNA isoliert. Die RNA Integrität wurde durch eine Elektrophorese der ribosomalen RNA überprüft. Mit Hilfe eines unspezifischen Poly-T-Primers wurde die mRNA per PCR amplifiziert. Anschließend wurde eine Reverse-Transkriptase-PCR mit spezifischen Primern (s.u.) der Firma MWG, Ebersberg durchgeführt.

TFF (Forward Primer): ATGGAGACCCCTGCCTGGCCCC

TFR (Reverse Primer): TTATGAAACATTTCAGTGGGGAGTTCTCCT

Das PCR-Protokoll wurde hinsichtlich Temperatur und Primermenge optimiert. Das entstandene PCR-Produkt wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft, mit Hilfe des Qiagen PCR Purifikation Kits gereinigt und durch eine Restriktionsanalyse charakterisiert. Mit Hilfe des pcDNA4/His Max TOPO TA Expression Kits von Invitrogen, Karlsruhe wurde die cDNA in einen Vektor eingebracht und in kompetente *E.coli* Zellen transferiert. Nach ausreichender Kultivierung der *E.coli* Zellen wurden fünf verschiedene Klone mit EcoRI auf den Plasmidvektor gescreent. Aus einem von zwei positiven Klonen wurde der Plasmidvektor pyrogenfrei isoliert und in lineare Form gebracht.

Der lineare Vektor wurde unter Anwendung von Effectene Transfection Reagent der Firma Qiagen, Hilden in MonoMac6 Zellen transferiert.

Als mögliche Kontrollzelllinie für folgende Versuche wurden MonoMac6 Zellen parallel nur mit einem Vektor ohne TF-Gen transfiziert. Diese Zelllinie wird im Folgenden als G418-Zelllinie bezeichnet.

Die Herstellung des Konstrukts, die Transfektion und der Western Blot zur Überprüfung der erfolgreichen Transfektion wurden von Dr. Peter Camaj, Klinische Forschung Chirurgie, Klinikum Großhadern durchgeführt.

5.2.5.2 Selektion

Um transfizierte und nicht-transfizierte Zellen zu trennen, enthielt der für die Transfektion verwendete Vektor ein Gen für eine Antibiotikumsresistenz. Hierdurch ergibt sich für die transfizierte Zelllinie ein Evolutionsvorteil. Die TF-transfizierte Zelllinie war somit resistent gegen Zeocin, für die G418-Zelllinie wurde ein Vektor mit einem Resistenzgen gegen Geneticin verwendet. Um die Zeocinkonzentration, bei der nur transfizierte Zellen überleben, festzustellen, wurden in einem Vorversuch nicht-transfizierte Zellen über zwei Passagen mit verschiedenen Konzentrationen an Zeocin behandelt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 2 dargestellt.

Konzentration Zeocin in mg/ml	Anteil toter Zellen in Prozent
0,1mg/ml	24
0,2mg/ml	28
0,4mg/ml	38
1,0mg/ml	54
2,0mg/ml	84

Tabelle 2: Prozentsatz toter nicht-transfizierter MonoMac6 Zellen nach zwei Passagen mit der angegebenen Zeocin Konzentration

Zu erkennen ist, dass erst ab einer Konzentration von 1,0mg/ml über 50% der nicht transfizierten Zellen starben, selbst 2,0mg/ml Zeocin führten nicht zum Tod sämtlicher Zellen.

Nach Erhalt der transfizierten MonoMac6 Zellen wurde der Antibiotikumsgehalt im Kulturmedium kontinuierlich erhöht, um den transfizierten Zellen die Möglichkeit zur Vermehrung, und somit zur Weitergabe der Antibiotikumsresistenz, zu geben. Die Anfangs- und Endkonzentration für Geneticin, sowie die Anfangskonzentration für Zeocin wurden nach Erfahrungswerten von Dr. Camaj festgelegt. Es wurde mit einer Verdünnung von 0,01mg/ml für Zeocin und 0,05mg/ml für Geneticin begonnen. Der Endwert für Zeocin wurde nach obigem Vorversuch von ursprünglich vorgesehenen 0,12mg/ml deutlich nach oben korrigiert. Zur Kontrolle wurden parallel nicht transfizierte MonoMac6 Zellen mit und ohne Antibiotikum in der gleichen Konzentration kultiviert. Durch eine Zellzählung in der Neubauer Zählkammer nach einer Trypanblaufärbung wurde jeweils der Anteil an toten Zellen bestimmt. Damit sich die transfizierte Population nach Ende der Selektion erholen konnte, wurde jeweils eine Passage ohne Antibiotikum eingefügt, bevor die Zellen dauerhaft mit der endgültigen Antibiotikumskonzentration kultiviert wurden. In Tabelle 3 und Tabelle 4 sind die verwendeten Konzentrationen und die Entwicklung des Anteils an toten Zellen in beiden Zellpopulationen dargestellt.

	Geneticin		
Passage	Konzentration in mg/ml	Anteil toter Zellen der nicht transfizierten Zellen in Prozent	Anteil toter Zellen der transfizierten Kontrollzellen in Prozent
1.	0,05	16	16
2.	0,1	22	16
3.	0,2	35	33
4.	0,3125	50	38
5.	0,4	75	40
6.	0,5	80	51
7.	0,59	96	69
8.	ohne Geneticin	100	63
9.-∞	0,5		

Tabelle 3: Anteil toter Zellen in der transfizierten und der nicht-transfizierten Kontrollpopulation während der Selektionsphase der G418-Zelllinie mit Geneticin

Es zeigte sich, dass nach 8 Passagen mit steigenden Geneticinkonzentrationen alle Zellen in der nicht-transfizierten Kontrollpopulation tot waren. In der Population mit transfizierten Zellen hatten 37% überlebt.

	Zeocin		
Passage	Konzentration in mg/ml	Anteil toter Zellen der nicht transfizierten Zellen in Prozent	Anteil toter Zellen der TF-transfizierten Zellen in Prozent
1.	0,01	20	20
2.	0,02	30	13
3.	0,04	54 (zu dicht ausgesät)	27
4.	0,0625	30	20
5.	0,08	28	19
6.	0,1	30	19
7.	0,12	39	32
8. - 10.	0,2	44/43/42	30/33/41
11.	0,4	59	40
12.	0,5	58	42
13.	0,67	63	47
14.-15.	1,0	77/67	61/66
16.	1,33	92	70
17.	0,5	96	81
18.-19.	0,1	98/100	78/74
20.	ohne Zeocin	100	51
21.-∞	0,13		

Tabelle 4: Anteil toter Zellen in der transfizierten und nicht-transfizierten Kontrollpopulation während der Selektionsphase der TF-transfizierten-Zelllinie mit Zeocin

Die korrigierte Endkonzentration für Zeocin wurde bei 1,33mg/ml festgesetzt, als 92% der nicht-transfizierten Zellen tot waren. Da in den Kontrollversuchen deutlich geworden war, dass die Zellen oft erst nach zwei Passagen mit derselben Zeocinkonzentration starben, wurde mehrmals die Konzentration für mehr als eine Passage konstant gehalten. Nach 20

Passagen waren alle Zellen in der nicht-transfizierten Kontrollpopulation gestorben, in der transfizierten Population hingegen waren 49% lebende Zellen. Um den Überlebensdruck für die transfizierten Zellen nicht zu stark werden zu lassen, wurde eine dauerhafte Zeocinkonzentration von 0,13mg/ml gewählt.

5.2.5.3 Überprüfung der Transfektanten

Zur Überprüfung des Erfolgs der Transfektion wurde ein Western Blot zur Bestimmung des TF-Proteins durchgeführt. Dazu wurden die Zellen lysiert und die Proteinmenge mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA), USA) bestimmt. Anschließend wurde eine SDS-Page Elektrophorese nach Laemmli[90] durchgeführt und die aufgetrennten Proteine auf Amersham Hybond P PVDF-Menbranen von GE Healthcare, Freiburg gebロットet. Dazu wurde mit Towbin-Puffer transferiert. Das Blotting erfolgte in einem semidry Verfahren. Als primärer Antikörper wurde ein muriner Antikörper gegen humanes CD142 (=TF) der Firma AbD Serotec, Düsseldorf eingesetzt, der sekundäre Antikörper war ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen Mausantigen der Firma DAKO, Eching. Der Antikörper ist an Horseradish Peroxidase gekoppelt, diese wurde mit Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagent auf Amersham ECL Hyperfilm detektiert. Als Waschpuffer wurde Tris-Tween gepufferte Saline (TTBS) verwendet, als Blocking-Puffer 10% Milchpulver in TTBS. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde mit Ponceau S angefärbt, als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet.

Zur Überprüfung der Funktionalität der transfizierten Zellen wurden Zellen der beiden transfizierten Zelllinien und MonoMac6 Zellen mit zwei verschiedenen LPS-Konzentrationen stimuliert, und die intrazelluläre Zytokinproduktion bestimmt. Zusätzlich wurde die Oberflächenexpression und die Aktivität von TF auf allen Zelllinien überprüft.

5.2.6 Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und humanen Monozyten

Blut von gesunden Probanden wurde in S-Monovetten mit 1,6mg EDTA/ml Blut zur Antikoagulation durch Punktion einer Vene abgenommen. Das Blut wurde 1:1 mit HBSS verdünnt und einer Ficoll-Trennung unterzogen. Dazu wurden in einem 50ml Polypropylen Tube (Firma Becton Dickinson, Heidelberg) 15-20ml vorgelegte Biocoll Lösung vorsichtig mit 15-25ml Blut/HBSS-Mischung überschichtet und bei 650xg für 20min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Ficoll ist ein Flotationsmittel mit einer Dichte, die so

gewählt ist, dass Zellen mit hoher Dichte, also Granulozyten und Erythrozyten, unter die Lösung absinken, Zellen mit kleinerer Dichte, also mononukleäre Zellen, jedoch auf der Ficollschicht angereichert werden. Darüber befindet sich nicht abzentrifugiertes Material, also Plasma und Thrombozyten. Die Schicht mononukleärer Zellen wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und mit kaltem HBSS in einem zweiten Röhrchen auf 50ml aufgefüllt. Dann wurde mit 840xg für 10min. bei 4°C zentrifugiert, um die Biocolllösung vollständig abzutrennen, und anschließend der Überstand abgekippt. Das Zellpellet wurde erneut in wenig HBSS resuspendiert und dann mit HBSS auf 50ml aufgefüllt. Der zweite Waschschrift erfolgte bei 470xg für 10min. bei 4°C. Der Überstand wurde wieder abgekippt und die gewonnenen PBMCs in einem für die Weiterverarbeitung geeigneten Puffer oder Medium aufgenommen.

Um aus den PBMCs Monozyten zu isolieren, wurde ein Adhärenzansatz durchgeführt. Zuerst wurde in einer Neubauerzählkammer die Gesamtzellzahl bestimmt und die Zellsuspension auf 1×10^6 PBMC/ml in RPMI mit 10% FCS eingestellt. Anschließend wurde durchflusszytometrisch, wie unter 5.2.3.2 beschrieben, der Anteil an Monozyten bestimmt. Dann wurde die Zellsuspension in 6-well Platten (Firma Greiner Labortechnik, Frickenhausen) gefüllt, so dass sich 1×10^6 Monozyten im Gesamtvolumen und 5-6ml Zellsuspension in einem well befanden. Während zwei Stunden Inkubation bei 37°C im Brutschrank adhären nur die Monozyten am Wellboden, die anderen mononukleären Zellen bleiben in Suspension. Der Überstand wurde verworfen, die Monozyten einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber (Firma TPP, Trasadingen, Schweiz) vom Wellboden abgekratzt und wie unter 5.2.7 beschrieben weiterbehandelt.

5.2.7 Tissue factor Aktivitätsmessung

Zur Messung der TF Aktivität wurde das Actichrome TF Kit der Firma American Diagnostica, Stamford, USA verwendet. Dieses Kit misst die prokoagulatorische Aktivität von TF. Dazu wird Zelllysate oder Plasma mit FVIIa und Faktor X gemischt. Die Mischung wird bei 37°C inkubiert, so dass sich der Komplex aus TF und FVIIa bilden und FX in FXa umwandeln kann. Die Menge an gebildetem FXa wird durch seine Fähigkeit Spectrozyme Xa umzusetzen bestimmt. Spectrozyme Xa ist ein hochspezifisches Substrat für FXa, durch die proteolytische Spaltung entsteht ein gelbes para-nitroanilin Chromophor. Die Absorption der Mischung wird bei 405nm gemessen und die TF-Aktivität anhand einer Standardkurve bestimmt.

Zur Messung der TF-Aktivität von MonoMac6 Zellen und humanen Monozyten wurden Zelllysate hergestellt. Als Lysepuffer wurde eine Lösung von 50mM Tris-HCl und 100nM NaCl in Wasser verwendet. Der pH wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. 1×10^6 Zellen wurden jeweils in 1ml Lysepuffer gegeben und 10sec mit einem SonoPlus Stab lysiert. Waren die Lysate nicht vollständig partikelfrei, wurden sie bei 25000xg für 10min. bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Lysate aliquotiert und bis zur Messung bei -80°C eingefroren.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Die Absorption wurde mit einem Versamax Reader bestimmt.

5.2.8 Bestimmung der Thrombinaktivität

Die Thrombinaktivität wurde durch die hydrolytische Spaltung von *N-p*-Tosyl-Gly-Pro-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (tos-GPR-AMC) bestimmt, ein fluorogenes Substrat, das durch Thrombin umgesetzt wird. Da die Reaktion nicht absolut spezifisch für Thrombin ist, wurde ausserdem der Anteil der Umsetzung gemessen, der durch 1µM Hirudin hemmbar war. Hirudin ist ein sehr spezifischer Hemmstoff für Thrombin, man erhält so den wirklich durch Thrombin verursachten Teil der Reaktion.

Die Bestimmung der Thrombinaktivität wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Sommerhoff, Abteilung Klinische Chemie und Klinische Biochemie, Klinikum der Universität München, durchgeführt.

5.2.9 Statistische Auswertung

Außer bei kinetischen Untersuchungen, oder wenn eine größere Fallzahl angegeben ist, ist stets der Mittelwert dreier unabhängiger Experimente dargestellt und der dazugehörige Standardfehler angegeben. Unterschiede zwischen verschieden behandelten Proben wurden in der Regel mit einem einfaktoriellen ANOVA Test bestimmt. Unterlagen die verwendeten Daten nicht der Normalverteilung, so wurde ein Kruskal-Wallis ANOVA für Ränge angewandt. Post-hoc wurde ein Mehrfachvergleich der einzelnen Probengruppen gegen eine Kontrollgruppe nach Dunnett durchgeführt. Waren die Probengruppen von unterschiedlicher Fallzahl, so wurde ein post-hoc Test nach Dunn`s verwendet. Wurden nur zwei Probengruppen verglichen, so wurde ein t-Test durchgeführt. Unterlagen die Daten nicht der Normalverteilung, wurde ein Rangsummentest angewendet. Die maximal akzeptierte Irrtumswahrscheinlichkeit für einen signifikanten Unterschied zwischen verglichenen Gruppen lag stets bei 5% entsprechend $p < 0,05$.

Manche Daten sind nicht in Absolutwerten angegeben, sondern als Prozentsatz des Mittelwerts der Kontrollgruppe. Diese Darstellung wurde gewählt, um von der Tagesform der Zellen abhängige Daten einer Gruppe vergleichbar zu machen.

Die elektronische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SigmaPlot10.0.

6 Ergebnisse

6.1 Optimierung der intrazellulären Zytokinmessung

6.1.1 Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration

Um für die jeweiligen Versuchsbedingungen die optimale Antikörperkonzentration zu kennen, wurden alle verwendeten Antikörper austitriert. Zu niedrige Antikörperkonzentrationen führen zu Unterscheidungsschwierigkeiten zwischen positiven und negativen Zellpopulationen, zu hohe Konzentrationen können zu unspezifischen Färbungen negativer Zellen führen. Gleichzeitig wurde die geeignete Einstellung des FACS-Gerätes ermittelt.

Abbildung 5 zeigt beispielhaft die Titrationskurve des TNF α -PE Antikörpers. Eine Sättigung wurde hier bei 2 μ l Antikörper erreicht.

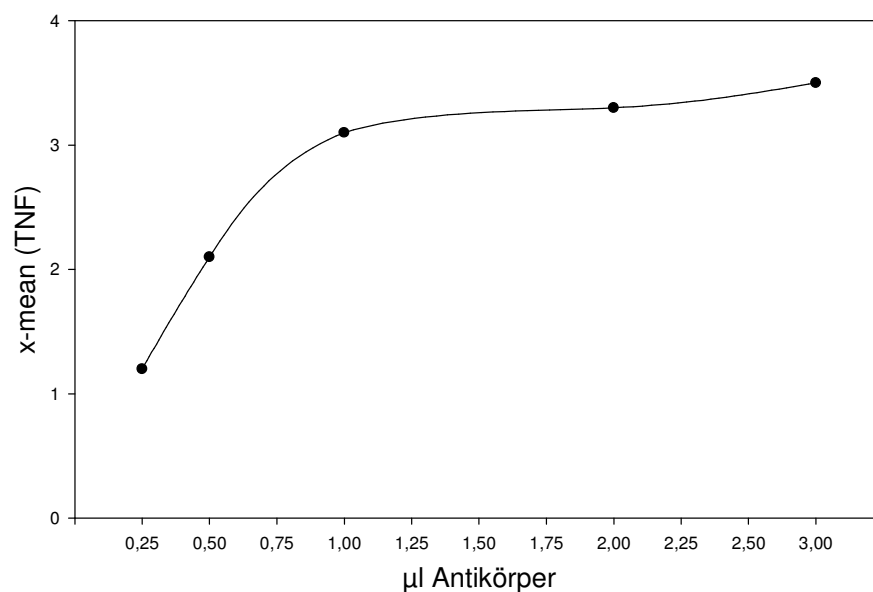


Abbildung 5: Sättigungskurve des TNF α -PE Antikörpers

6.1.2 Optimierung der Sekretionsinhibition

MonoMac6 Zellen wurden mit 1000ng/ml LPS stimuliert. Zum Vergleich wurden entweder 10 μ g/ml Brefeldin oder 3 μ M Monensin zur Sekretionsinhibition zugesetzt, und die intrazelluläre TNF α -Produktion, wie unter 5.2.3.3 beschrieben, nach zwei Stunden bestimmt. Beide Reagenzien lösten ohne LPS Zugabe keine Zytokinproduktion aus. Der

Anteil an TNF α produzierenden Zellen war unter Brefeldin Behandlung höher (50,5%), als unter Monensin Behandlung (45,6%). Deshalb wurden alle weiteren Versuche mit Brefeldin durchgeführt. (Daten nicht abgebildet)

6.1.3 Optimierung der Stimulation mit LPS

Zur Optimierung der Inkubationszeit wurden MonoMac6 Zellen für die angegebenen Zeiträume mit 1000ng/ml stimuliert und die intrazelluläre Zytokinproduktion, wie unter 5.2.3.3 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

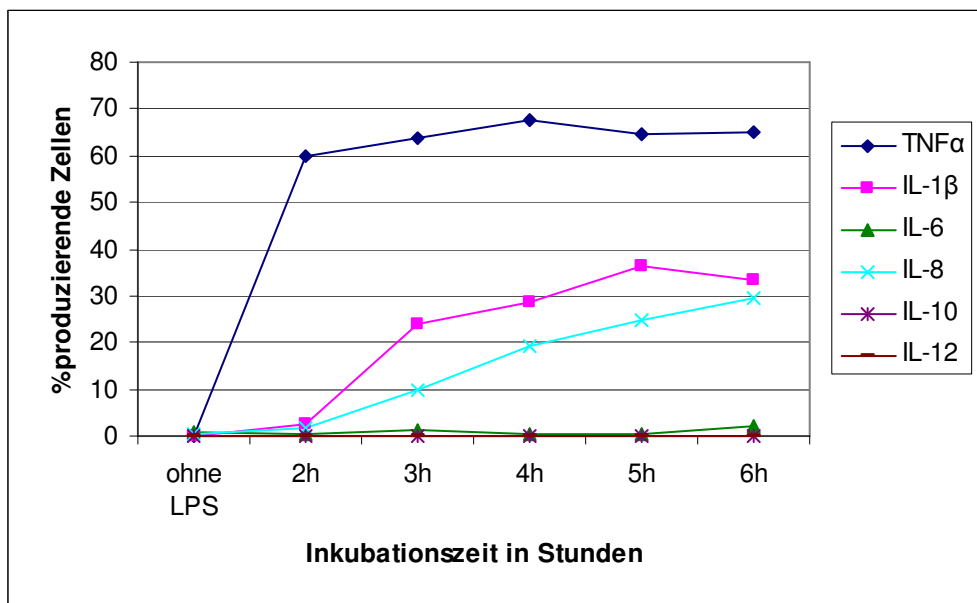


Abbildung 6: Anteil an Zytokin-produzierenden Zellen von MonoMac6 Zellen nach den angegebenen Inkubationszeiten mit 1000ng/ml LPS (n=1)

Aus Abbildung 6 ergab sich eine optimale Inkubationszeit von vier Stunden für MonoMac6 Zellen. Der Anteil an TNF α -produzierenden MonoMac6 Zellen war zu diesem Zeitpunkt am höchsten und IL-8 und IL-1 β wurden bereits in messbaren Mengen synthetisiert. Eine längere Inkubationszeit ergab zwar höhere Werte für IL-1 β und IL-8, aber, um den Versuchsaufbau in einem praktikablen zeitlichen Rahmen zu halten, wurde die minimal benötigte Inkubationszeit gewählt. Wird nur TNF α bestimmt, ist das bereits nach zwei Stunden möglich. IL-6, IL-10 und IL-12 wurden innerhalb von sechs Stunden nicht in nachweisbarer Menge produziert. Dass MonoMac6 Zellen kein IL-6 synthetisieren, welches normalerweise ungefähr gleichzeitig mit IL-8 ansteigt, stellt einen Nachteil dieser Zelllinie dar.

Zur Optimierung der verwendeten LPS-Konzentration wurden MonoMac6 Zellen vier Stunden mit 200 bzw. 1000ng/ml LPS stimuliert und die intrazelluläre Zytokinsynthese, wie unter 5.2.3.3 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

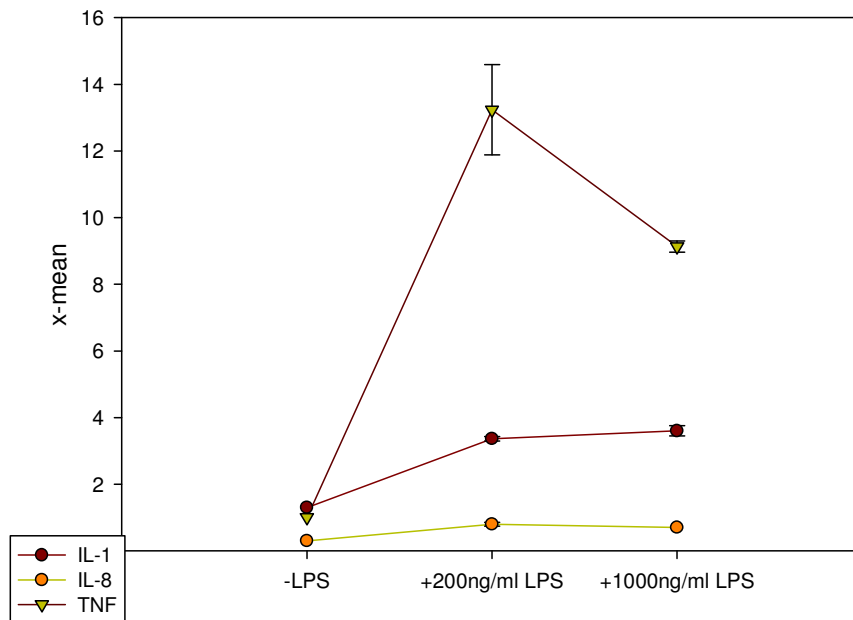


Abbildung 7: Zytokinsynthese von MonoMac6 Zellen nach den angegebenen Inkubationszeiten mit 200 bzw. 1000ng/ml LPS, ausgedrückt als mittlere Fluoreszenzaktivität (n=3)

Betrachtet man die Synthese von IL-1 β und IL-8, führte eine Stimulation mit 200 oder 1000ng/ml LPS zu statistisch gleichwertigen Ergebnissen. Für die TNF α -Produktion der MonoMac6 Zellen scheint eine Konzentration von 1000ng/ml LPS bereits schädlich zu sein, 200ng/ml führen zu einer signifikant höheren Syntheseleistung.

Zur Optimierung der Inkubationszeit für CD14⁺ Zellen aus PBMCs, wurden diese Zellen einer gesunden Person für drei bzw. vier Stunden mit 200 bzw. 1000ng/ml LPS stimuliert und die Zytokinproduktion durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

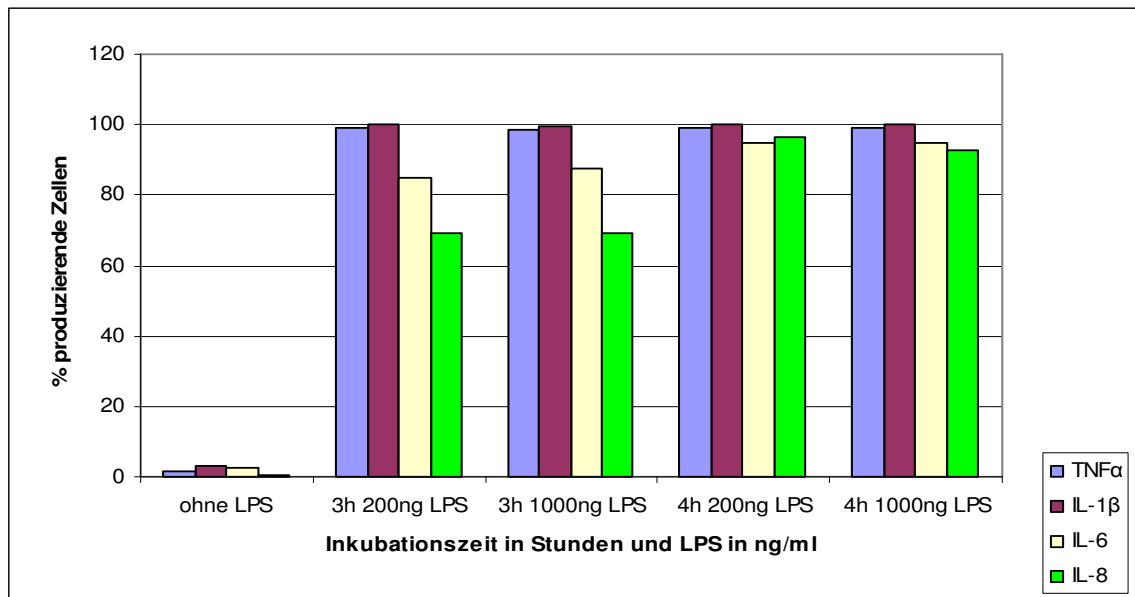


Abbildung 8: Anteil an Zytokin produzierenden Zellen der CD14+ PBMCs nach den angegebenen Inkubationszeiten mit 200 bzw. 1000ng/ml LPS (n=1)

PBMCs reagierten deutlich sensibler auf LPS, wie Abbildung 8 beweist. Innerhalb von vier Stunden führten beide LPS Konzentrationen zu einer Produktion von TNFα, IL-1β, IL-6 und IL-8 bei nahezu 100% der Zellen. In Abbildung 9 wird deutlich, dass auch hier eine Inkubationszeit von vier Stunden notwendig war, um eine ausreichende Syntheserate pro Zelle, erkennbar an der mittleren Fluoreszenzintensität, für IL-8 zu erreichen. Eine Dosisveränderung von 200 auf 1000ng/ml LPS erhöhte lediglich die bereits sehr hohe TNFα-Menge, war also nicht notwendig, um auswertbare Ergebnisse zu bekommen.

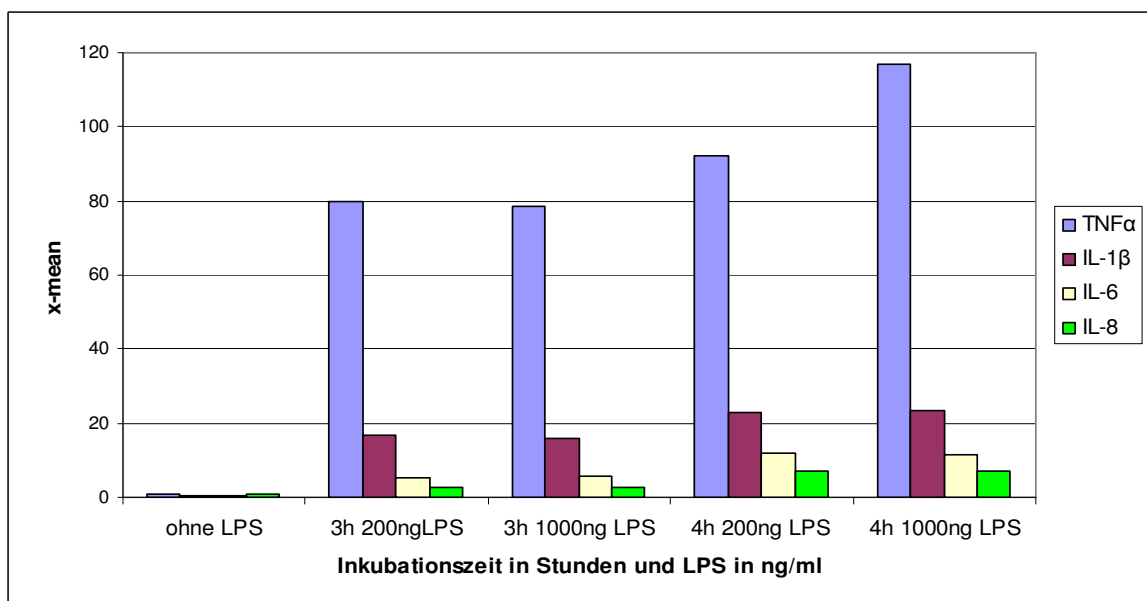


Abbildung 9: Zytokinproduktion von CD14+ PBMCs nach den angegebenen Inkubationszeiten mit 200 bzw. 1000ng/ml LPS, ausgedrückt als mittlere Fluoreszenzaktivität (n=1)

6.1.4 Aushungern der Zellen

Um die Stimulierbarkeit von FCS-ausgehungenen MonoMac6 Zellen, die potentiell empfindlicher auf Mediumszusätze reagieren, zu überprüfen, wurden diese über 24 Stunden mit Medium mit 0,1% FCS statt 10% FCS kultiviert. Anschließend wurde die Reaktion dieser Zellen auf 1000ng/ml LPS mit der herkömmlich kultivierter MonoMac6 Zellen verglichen. Dazu wurden die Zellen jeweils vier Stunden stimuliert und anschließend die Zytokinproduktion, wie unter 5.2.3.3 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

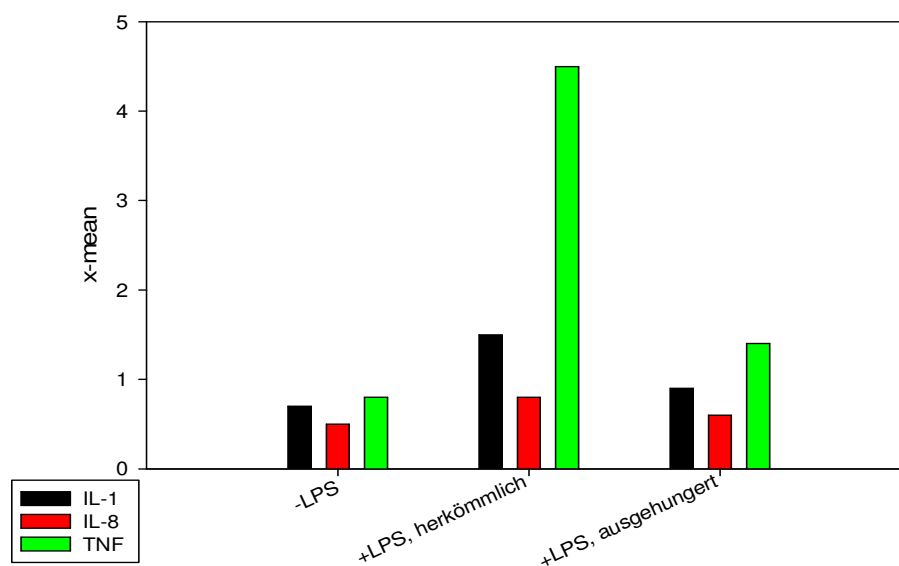


Abbildung 10: Vergleich der Zytokinproduktion über Nacht FCS-ausgehungerter MonoMac6 Zellen mit der herkömmlich kultivierter MonoMac6 Zellen nach vierstündiger Inkubation mit 1000ng/ml LPS (n=1)

Das Aushungern der Zellen führte zu einer deutlich verringerten Zytokinsynthese der Zellen. Deshalb wurden die Zellen vor dem Einsatz für Versuche nicht auf diese Weise behandelt.

6.2 Einfluss von aktiviertem Protein C auf die LPS induzierte Zytokinantwort von MonoMac6 Zellen

6.2.1 Festlegung der Versuchsabläufe

Um den Einfluss von APC auf die Zytokinantwort zu betrachten, wurden MonoMac6 Zellen für eine Stunde damit präinkubiert. Anschließend wurden 1000ng/ml LPS als

Stimulus zugefügt. Als Kontrolle wurden alle Experimente auch ohne LPS-Stimulus durchgeführt. Brefeldin wurde stets gleichzeitig mit APC zugegeben. Die LPS-Konzentration wurde aus einer im Vorfeld durchgeführten Studie übernommen, bei der der Einfluss von APC und ATIII auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion von Zellen polytraumatisierter Patienten untersucht wird (unpublizierte Daten). Als Inkubationszeit mit LPS wurde vier Stunden gewählt. TNF α wurde in einigen Versuchen bereits nach zwei Stunden gemessen, da dieses Zytokin bereits nach dieser kurzen Zeit gut nachweisbar ist. Auch die Konzentrationen für APC (4 und 100 μ g/ml) wurden aus der oben erwähnten Studie übernommen. Bei der klinischen Anwendung von APC während schwerer Sepsis wird üblicherweise eine Dosis von 24 μ g/kg KG/h über 96 Stunden gegeben. Geht man von einem Blutvolumen von 60ml pro kg KG aus, entspricht diese Dosis 0,4 μ g/ml Blut/h. Somit entsprechen 4 μ g/ml APC also etwa der in 10 Stunden verabreichten therapeutischen Dosis, 100 μ g/ml überschreitet den therapeutischen Bereich deutlich.

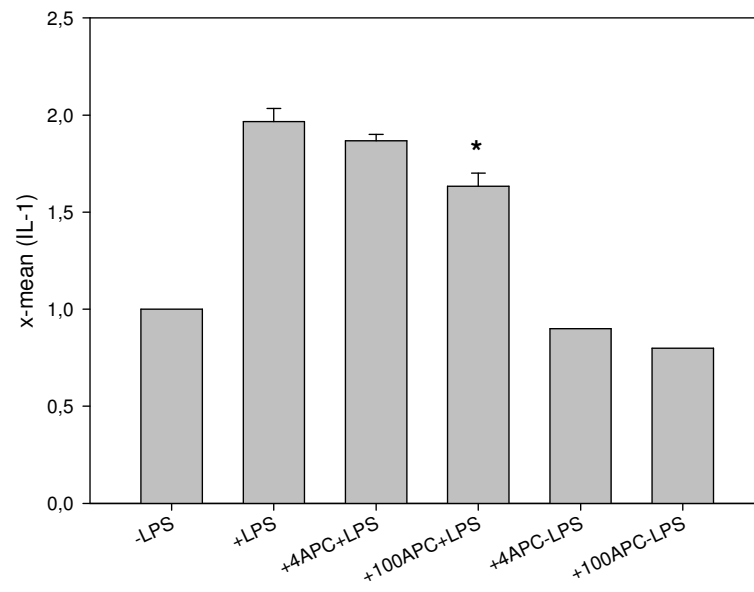
Neben einer Versuchsreihe mit herkömmlichem, serumhaltigem Medium wurde auch eine Serie mit MonoMac6 in vollkommen serumfreiem Medium durchgeführt, da Schmidt-Supprian et al. eine Serum-vermittelte Inhibition des APC-Effekts beschrieben haben.[91]

6.2.2 Versuche mit serumhaltigem Stimulationsmedium

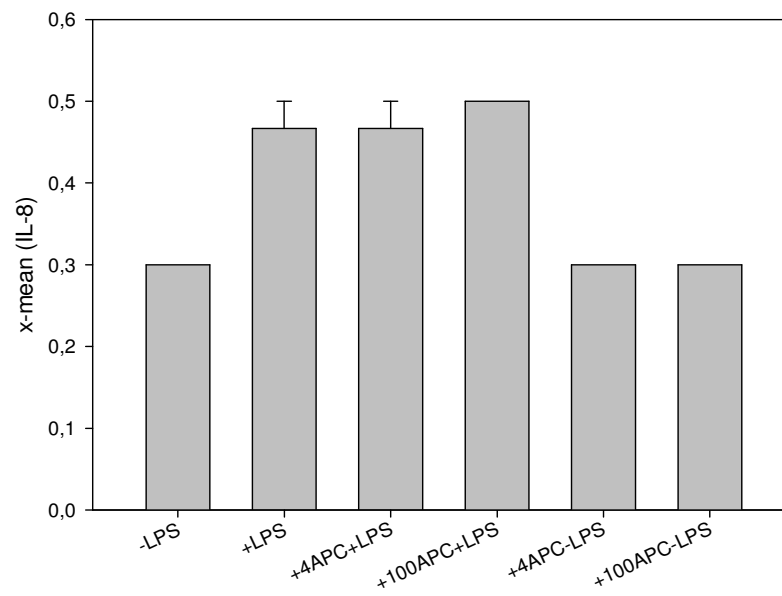
6.2.2.1 Durchflusszytometrie

Wie unter 6.2.1 beschrieben, wurden MonoMac6 Zellen mit 4 bzw. 100 μ g/ml APC präinkubiert und anschließend mit 1000ng/ml LPS stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert gelassen. Die Produktion von IL-1 β , IL-8 und TNF α wurde, wie unter 5.2.3.3 beschrieben, nach weiteren vier Stunden Inkubationszeit bestimmt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Versuche mit APC in serumhaltigem Stimulationsmedium sind in Abbildung 11 dargestellt.

A



B



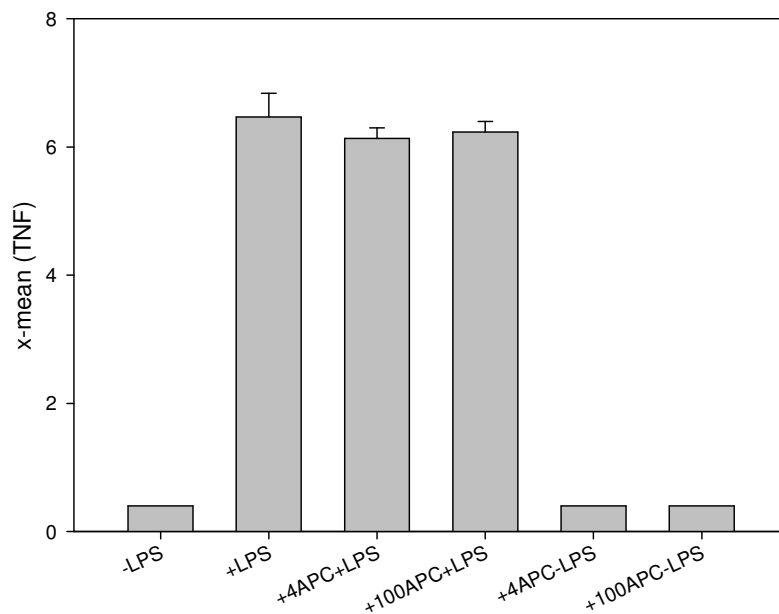
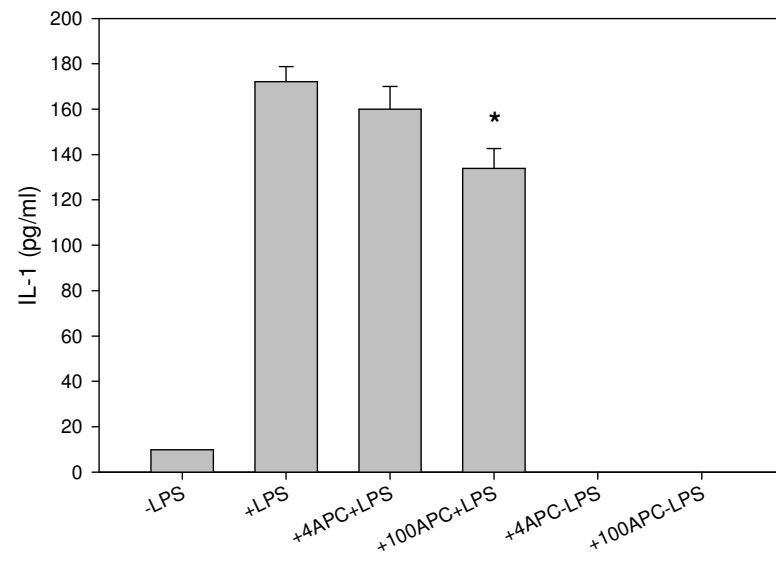
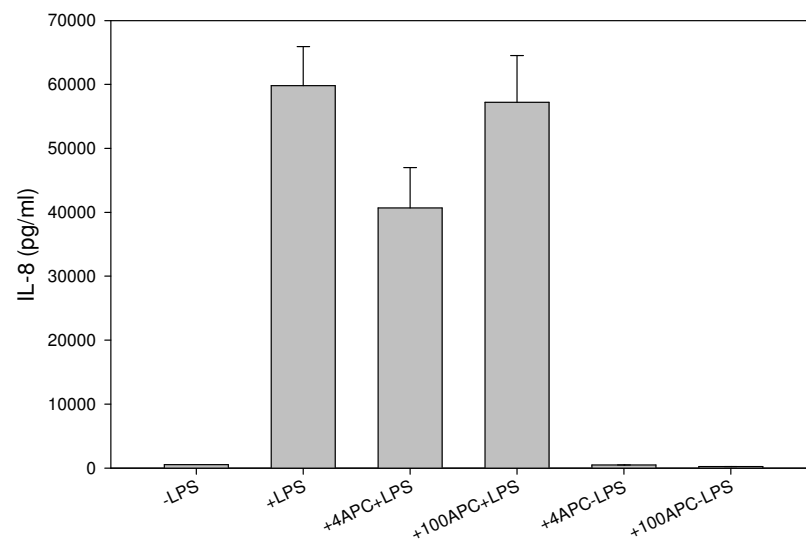
C

Abbildung 11: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von APC ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen in serumhaltigem Medium (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p < 0,05$; ANOVA, $n=3$)

In Abbildung 11A ist zu erkennen, dass die LPS-induzierte IL-1 β -Synthese unter dem Einfluss von 100 $\mu\text{g/ml}$ APC um 17% vermindert war. Diese Verminderung ist entsprechend der definierten Kriterien signifikant. Die TNF α - und IL-8-Produktion blieb unverändert. APC alleine führte zu keiner Zytokinsynthese.

6.2.2.2 Bioplexmessungen

Nach einer Stunde Präinkubation mit 4 bzw. 100 $\mu\text{g/ml}$ APC wurden MonoMac6 Zellen mit 1000ng/ml LPS stimuliert und weitere 23 Stunden inkubiert. Wie unter 5.2.4.2 beschrieben, wurden IL-1 β , IL-8, IL-10 und TNF α aus den Zellkulturüberständen bestimmt. Versuche ohne Zugabe von LPS dienten als Kontrolle. Die Ergebnisse der Versuche mit serumhaltigem Medium sind in Abbildung 12 dargestellt.

A**B**

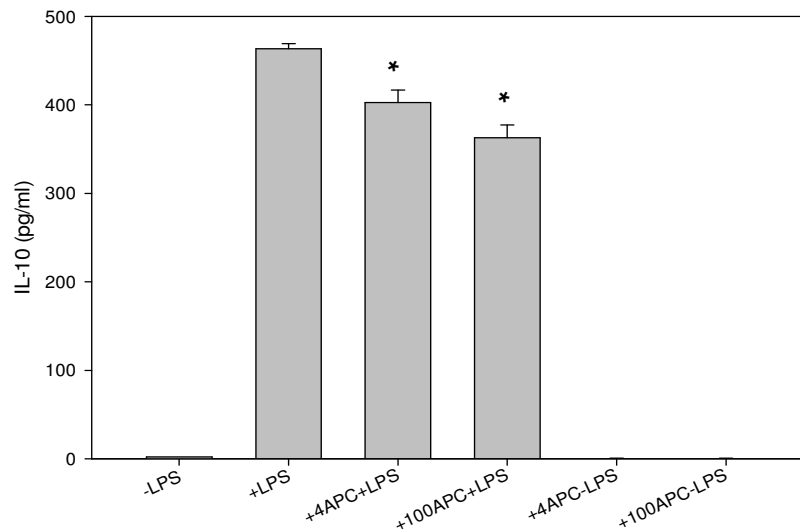
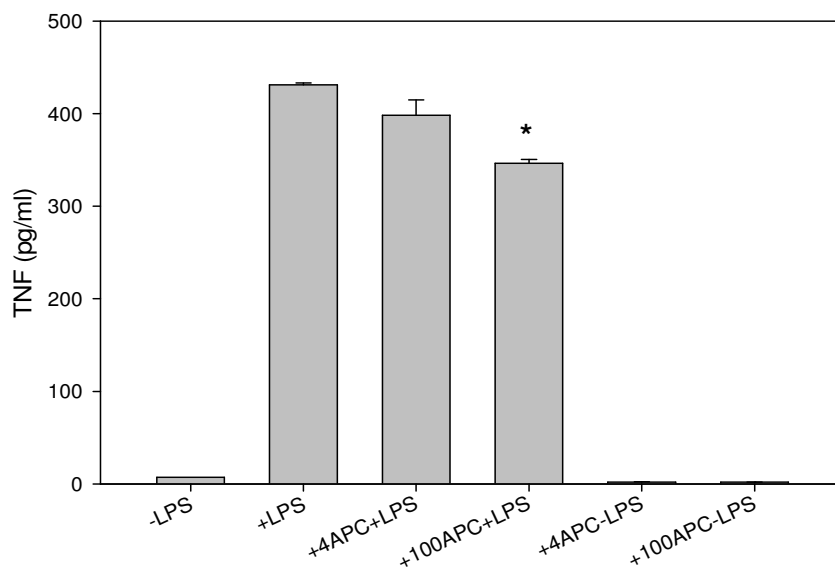
C**D**

Abbildung 12: Bioplex-Bestimmung des Einflusses von APC (µg/ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1β; B: IL-8; C: IL-10; D: TNFα) von MonoMac6 Zellen in serumhaltigem Medium (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; p<0,05; ANOVA, n=3)

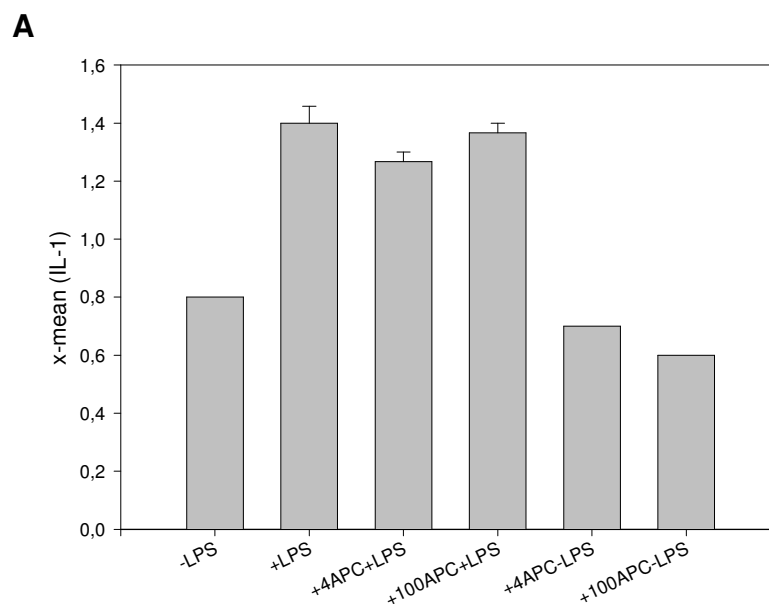
Bei den Überstandsmessungen war eine verminderte LPS-induzierte Zytokinausschüttung für alle gemessenen Zytokine, außer IL-8, unter dem Einfluss von 100µg/ml APC erkennbar. Die Konzentration sank um 22% (IL-1β, IL-10) bzw. 20% (TNFα). Die IL-10-Sekretion wurde bereits von 4µg/ml APC um 13% reduziert. (Abbildung 12C) Alle

genannten Veränderungen waren statistisch signifikant. APC alleine führte zu keiner Erhöhung der Zytokinkonzentration im Überstand.

6.2.3 Versuche mit serumfreiem Stimulationsmedium

6.2.3.1 Durchflusszytometrie

In serumfreiem Medium wurden die Versuche mit APC analog zu denen in serumhaltigem Medium durchgeführt, lediglich TNF α wurde bereits nach zwei Stunden Inkubationszeit mit LPS gemessen. Mit der durchflusszytometrischen Messmethode war in serumfreiem Stimulationsmedium weder ein Einfluss von APC auf die LPS-induzierte Produktion der gemessenen Zytokine feststellbar, noch wurde eine Zytokinsynthese durch APC ausgelöst. (siehe Abbildung 13)



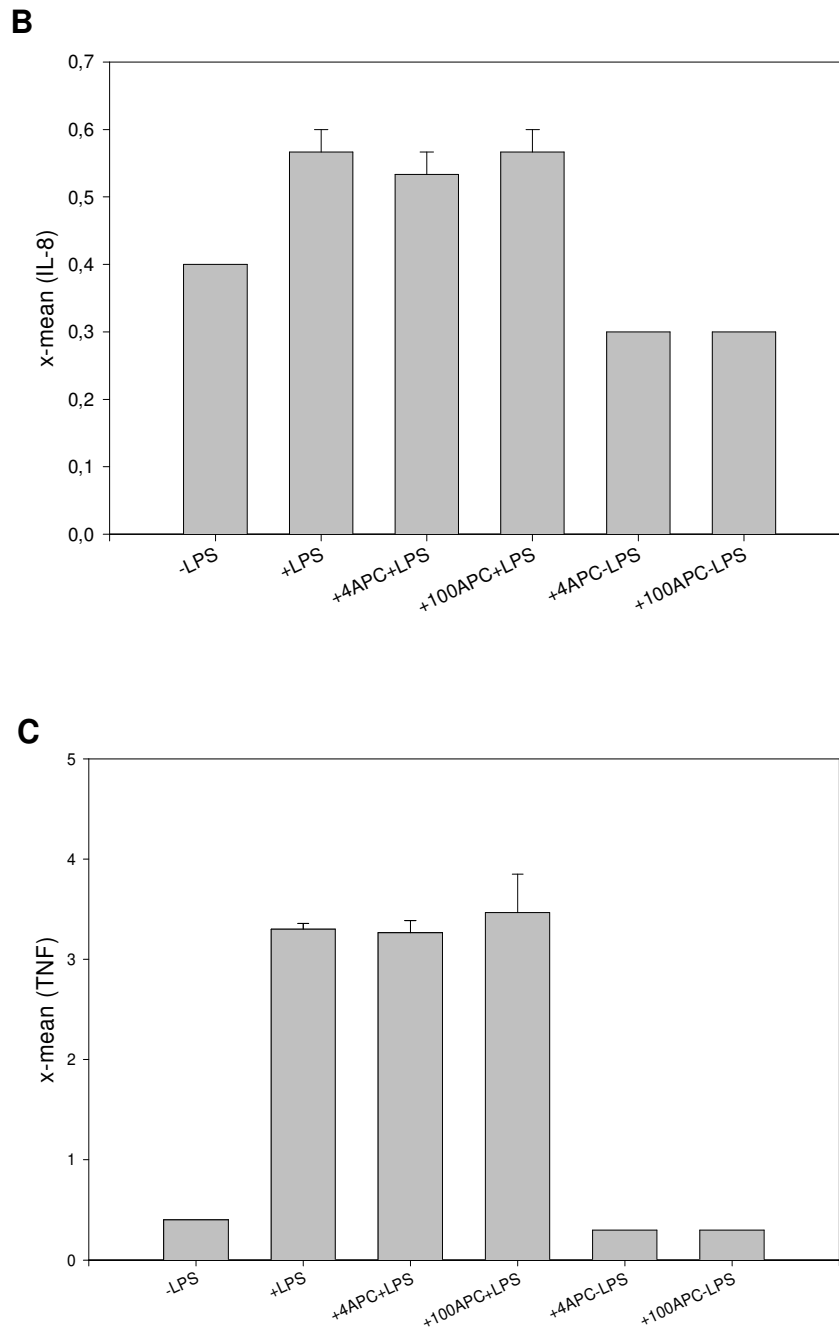
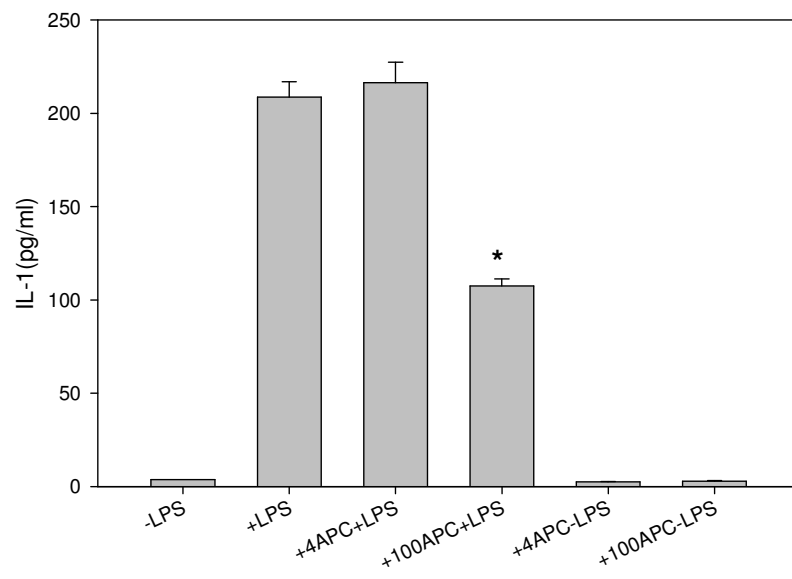


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von APC ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen in serumfreiem Medium (+LPS=1000ng/ml) (n=3)

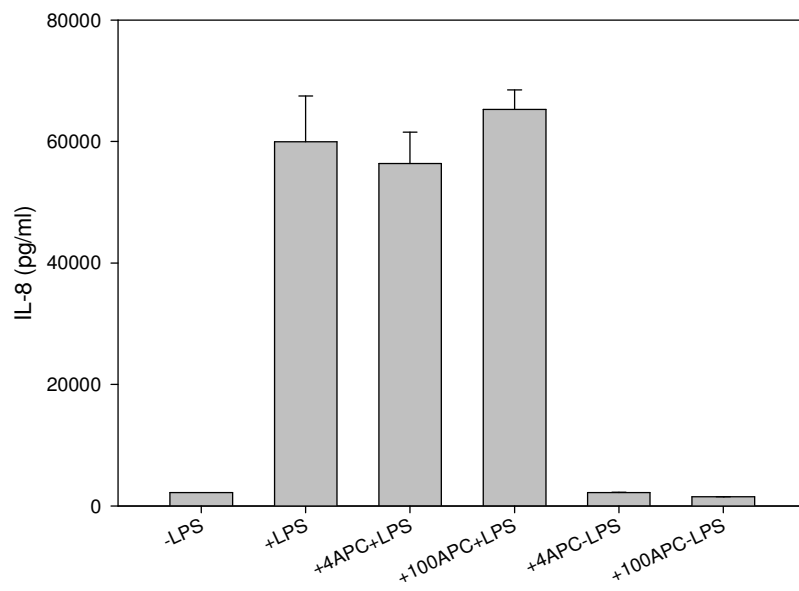
6.2.3.2 Bioplexmessungen

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Bioplexmessungen aus Überständen von Versuchen mit APC in serumfreiem Stimulationsmedium dargestellt. Die Durchführung erfolgte wie unter 6.2.2.2 beschrieben.

A



B



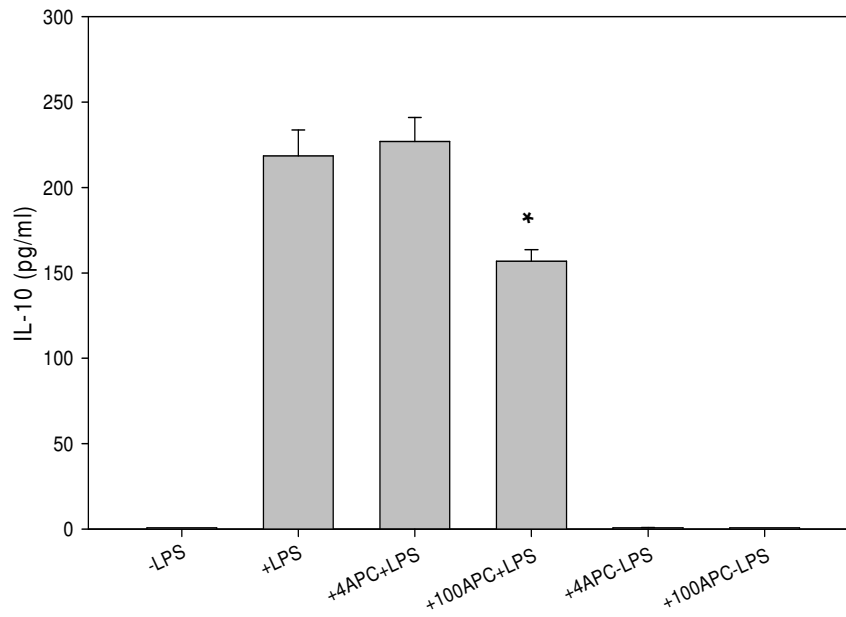
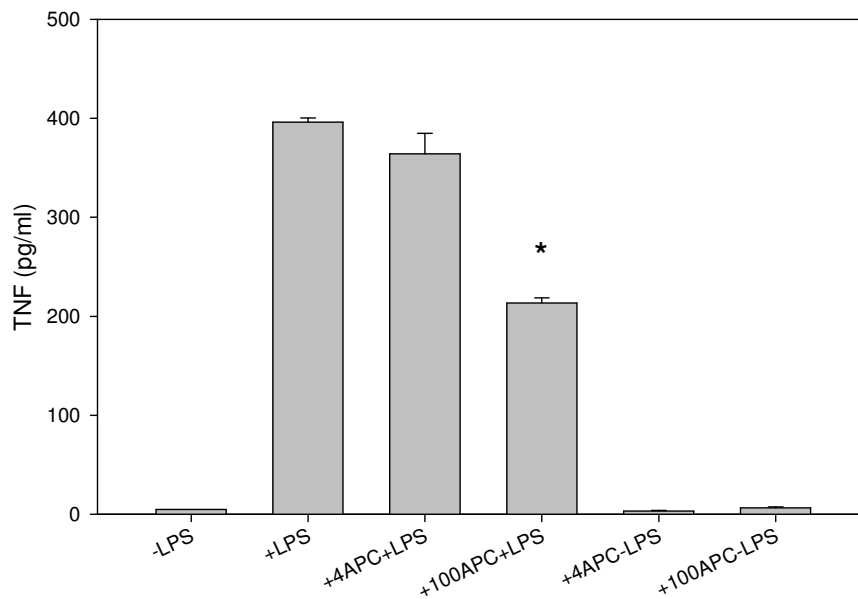
C**D**

Abbildung 14: Bioplex Bestimmung des Einflusses von APC ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen in serumfreiem Medium (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p<0,05$; ANOVA, $n=3$)

Es war eine deutlich verminderte LPS-induzierte Zytokinsekretion für IL-1 β (um 48%), IL-10 (um 28%) und TNF α (um 46%) unter Einfluss von 100 $\mu\text{g/ml}$ APC zu sehen. Die

niedrigere APC Konzentration zeigte keine signifikante Wirkung. IL-8 blieb stets unverändert. APC alleine führte zu keiner Zytokinproduktion.

6.3 Einfluss von Antithrombin III auf die LPS induzierte Zytokinantwort von MonoMac6 Zellen

6.3.1 Festlegung der Versuchsabläufe

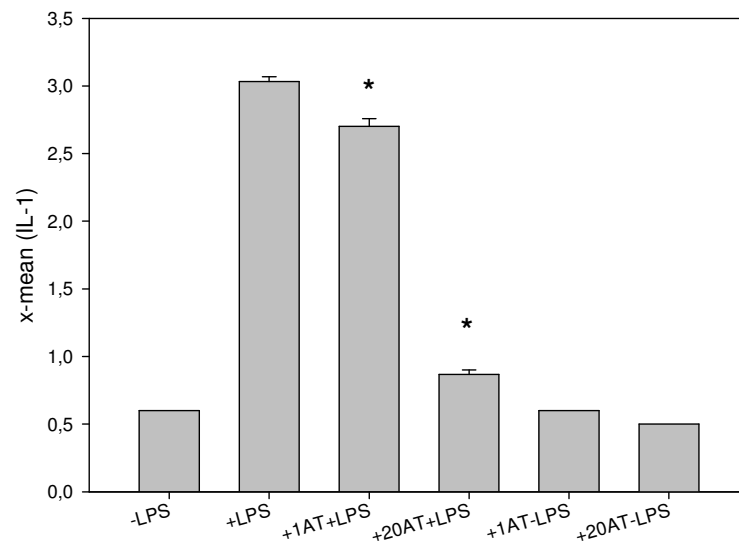
Die Versuche zur Untersuchung des Einflusses von ATIII auf die Zytokinantwort von Monozyten wurden nach dem gleichen Prinzip wie die Versuche mit APC durchgeführt. Auch die Konzentrationen für ATIII (1 und 20 I.E./ml) wurden aus der in 6.2.1 erwähnten Studie übernommen. 1 I.E. ATIII entspricht dem ATIII-Gehalt von 1 ml gepooltem humanen Zitratplasma. Als therapeutische Dosis werden als Initialdosis 6000 I.E. gegeben. Geht man von durchschnittlich 70 kg KG aus und 60 ml Blutvolumen pro kg KG, entspricht das 14 I.E. pro ml Blut. Die höhere der verwendeten Konzentrationen liegt also im therapeutischen Bereich, die niedrigere im physiologischen. Um die Wirkung von Heparin in Kombination mit ATIII zu beobachten, wurden 20 I.E. ATIII mit verschiedenen Mengen an Heparin (5-200 I.E.) versetzt, 30 min bei 4°C inkubiert, und diese Mischung zur einstündigen Präinkubation auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde mit LPS stimuliert. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Effekt von Heparin alleine auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion von MonoMac6 Zellen betrachtet.

6.3.2 Effekt von Antithrombin

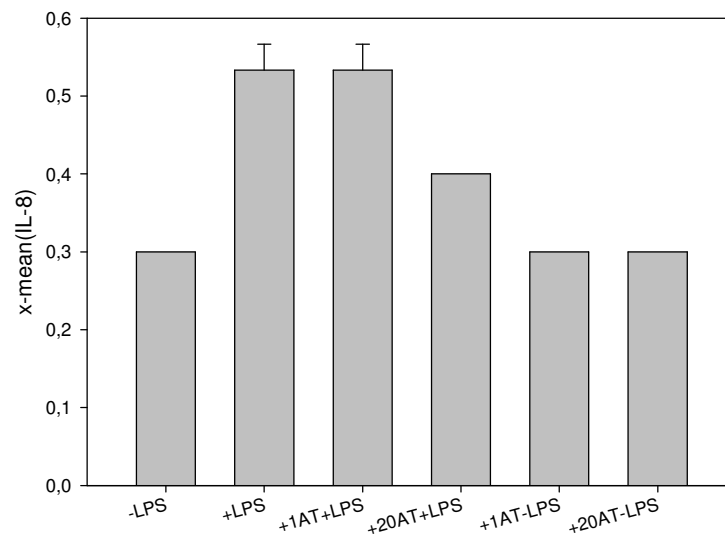
6.3.2.1 Durchflusszytometrie

Um den Einfluss von ATIII auf die Zytokinantwort von MonoMac6 Zellen zu untersuchen, wurden diese zuerst eine Stunde mit 1 bzw. 20 I.E./ml ATIII präinkubiert und anschließend für vier (IL-1 β , IL-8) bzw. zwei (TNF α) Stunden mit 1000 ng/ml LPS stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Proben. Die Produktion von IL-1 β , IL-8 und TNF α wurde, wie unter 5.2.3.3 beschrieben, bestimmt. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse dargestellt.

A



B



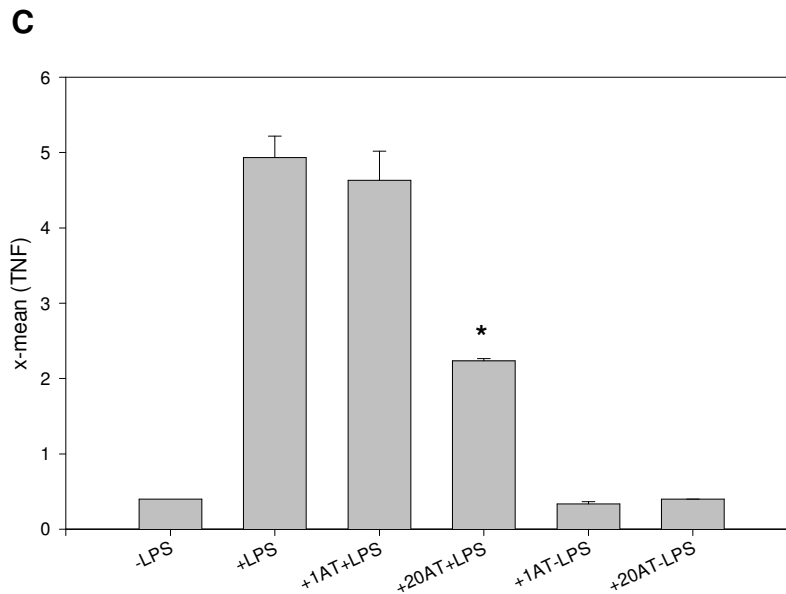
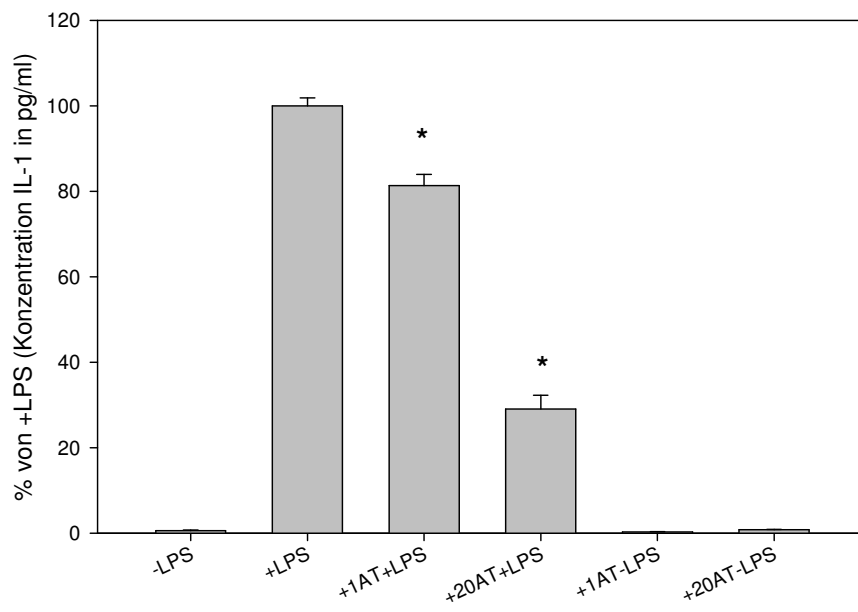
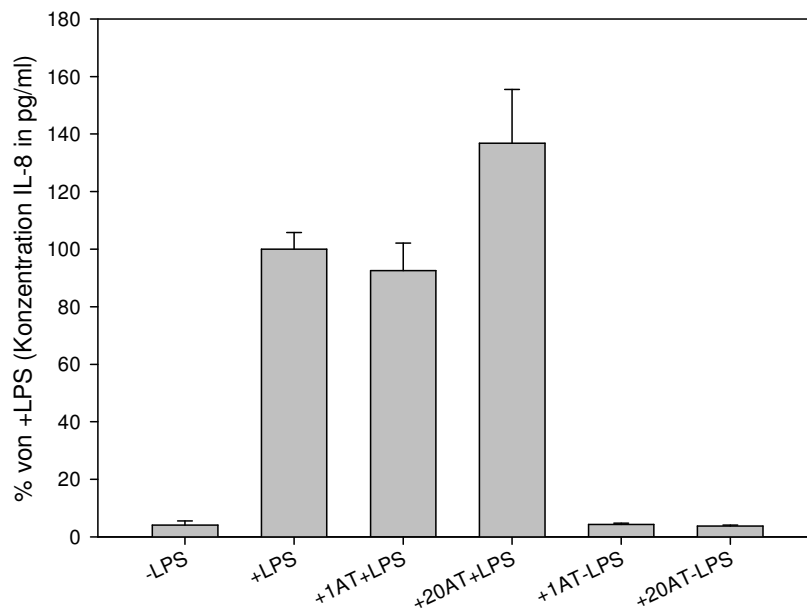


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von ATIII (I.E./ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p < 0,05$; ANOVA, $n=3$)

Bei einer Konzentration von 20 I.E./ml ATIII beobachtet man eine signifikante Verminderung der LPS-induzierten Synthese von IL-1 β um 71% und von TNF α um 55%. Für IL-1 β war diese Tendenz bereits bei einer Konzentration von 1 I.E./ml zu sehen, für TNF α waren 20 I.E./ml nötig, um einen signifikanten Unterschied zu erzeugen. IL-8 zeigte zwar ebenfalls eine deutliche Reduktion um 25%, ohne dass dies jedoch ein statistisch signifikantes Niveau erreicht hätte. Das 95% Konfidenzintervall der Mittelwertdifferenz der Gruppen +LPS und +20AT+LPS für IL-8 liegt bei -0,1 bis 0,27, deutet also auf keinen vorhandenen Unterschied hin. ATIII alleine führte zu keiner signifikant erhöhten Zytokinproduktion.

6.3.2.2 Bioplexmessungen

Bei den Zytokinbestimmungen aus dem Zellkulturüberstand nach einer Stunde Präinkubation mit ATIII (1 und 20 I.E./ml) und anschließenden 23 Stunden Stimulation mit 1000ng/ml LPS, wurde wie unter 5.2.4.2 beschrieben vorgegangen. Zur Kontrolle wurden alle Experimente auch ohne LPS-Stimulus durchgeführt. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Gruppen +LPS und +20AT+LPS wurden insgesamt mit $n=9$ durchgeführt, da sie auch als Kontrollgruppen in den Versuchen mit Heparin und ATIII in Kombination dienten.

A**B**

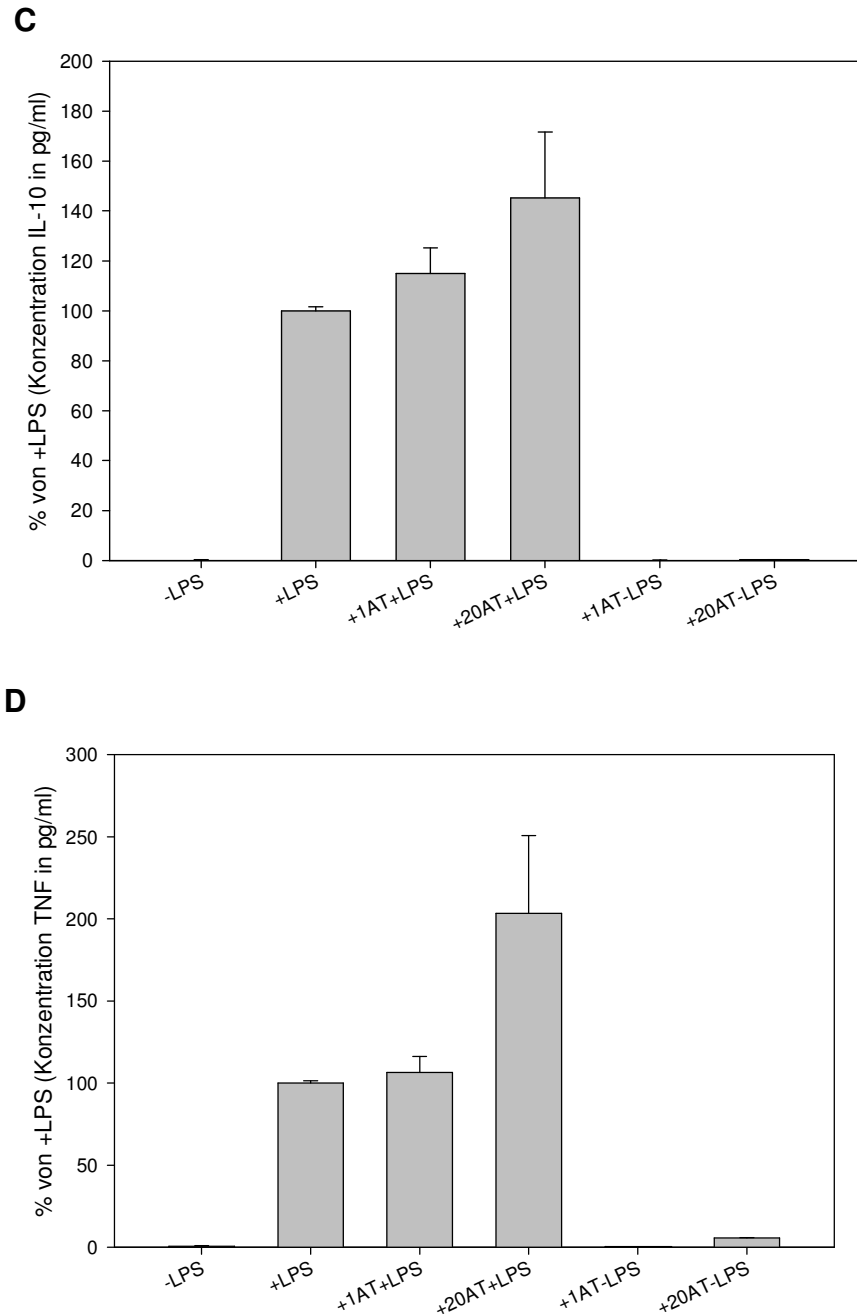


Abbildung 16: Bioplex Bestimmung des Einflusses von ATIII (I.E./ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p < 0,05$; ANOVA, $n=3$, bei +LPS und +20AT+LPS $n=9$)

Unter Einfluss von ATIII war eine signifikant verminderte LPS-induzierte Sekretion von IL-1 β (bei 1I.E./ml um 19% und bei 20I.E./ml um 71%) zu erkennen. Die IL-8-, IL-10- und TNF α -Produktion zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen. Die Veränderung durch die Zugabe von 20I.E. ATIII zusätzlich zu LPS erscheint zwar jeweils relativ hoch, das 95% Konfidenzintervall der Mittelwertdifferenz der Gruppen +LPS und

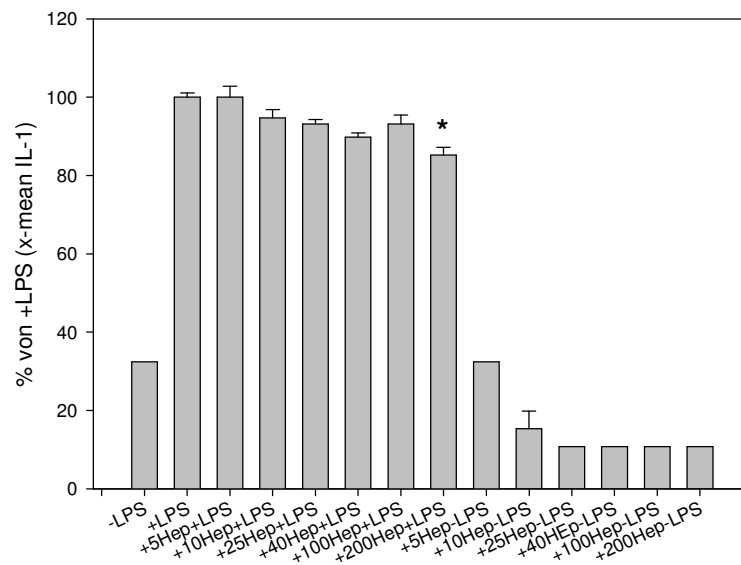
+20AT+LPS deutet jeweils darauf hin, dass tatsächlich kein Unterschied vorhanden ist. So ergab beispielsweise die Präinkubation mit 20I.E. ATIII zwar eine um 103% erhöhte TNF α Synthese, das 95% Konfidenzintervall lag jedoch bei -212,7 bis +5,9, was ebenfalls auf keinen vorhandenen Unterschied hindeutet.

6.3.3 Effekt von Heparin

6.3.3.1 Durchflusszytometrie

Um die Ergebnisse der Versuche mit Heparin und ATIII in Kombination besser interpretieren zu können, wurde auch der Einfluss von Heparin alleine auf die Zytokinantwort von MonoMac6 Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen eine Stunde mit Heparin in Konzentrationen von 5 bis 200I.E./ml präinkubiert und anschließend mit 1000ng/ml LPS stimuliert oder zur Kontrolle unstimuliert gelassen. TNF α wurde nach zwei Stunden, IL-1 β und IL-8 nach vier Stunden, wie unter 5.2.3.3 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

A



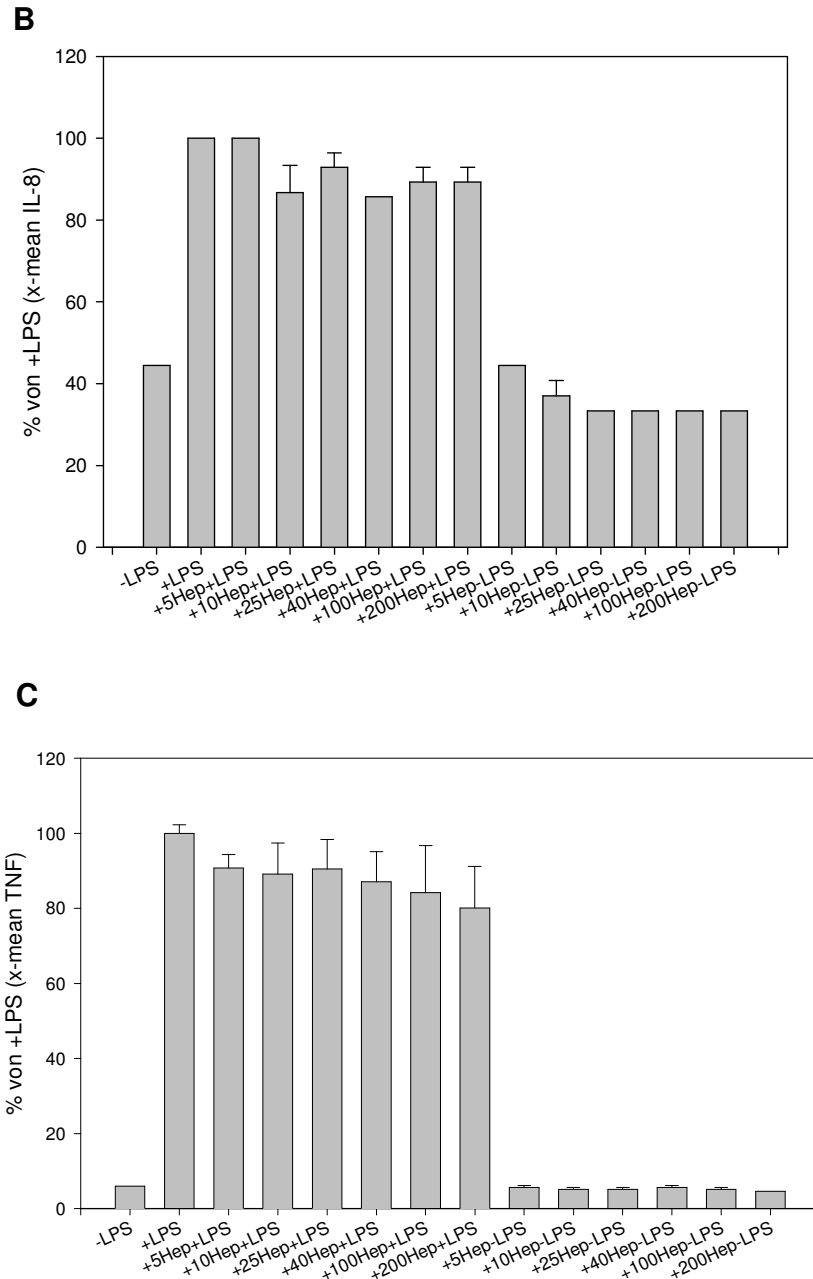


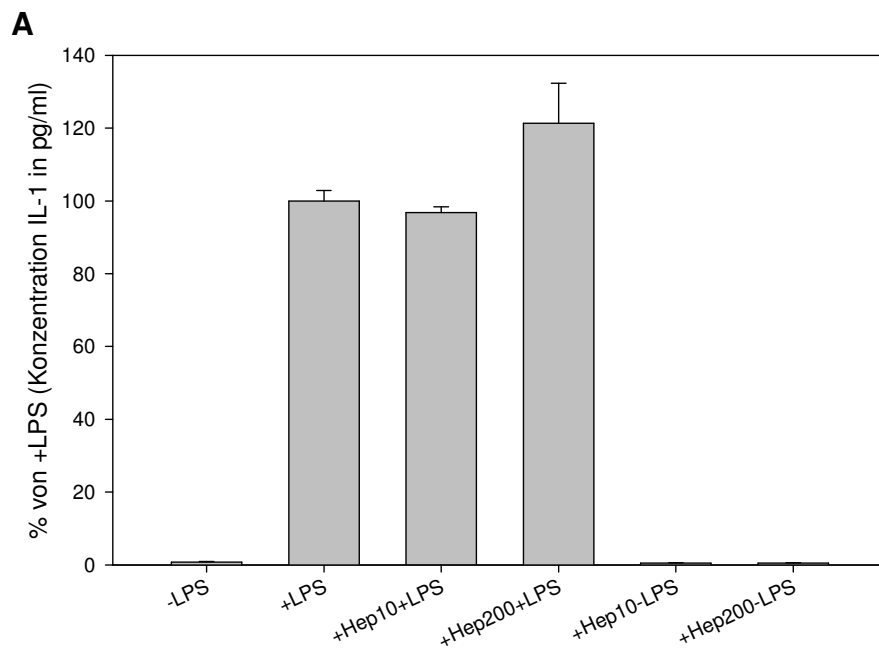
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von Heparin (I.E./ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p < 0,05$; ANOVA, $n=3$)

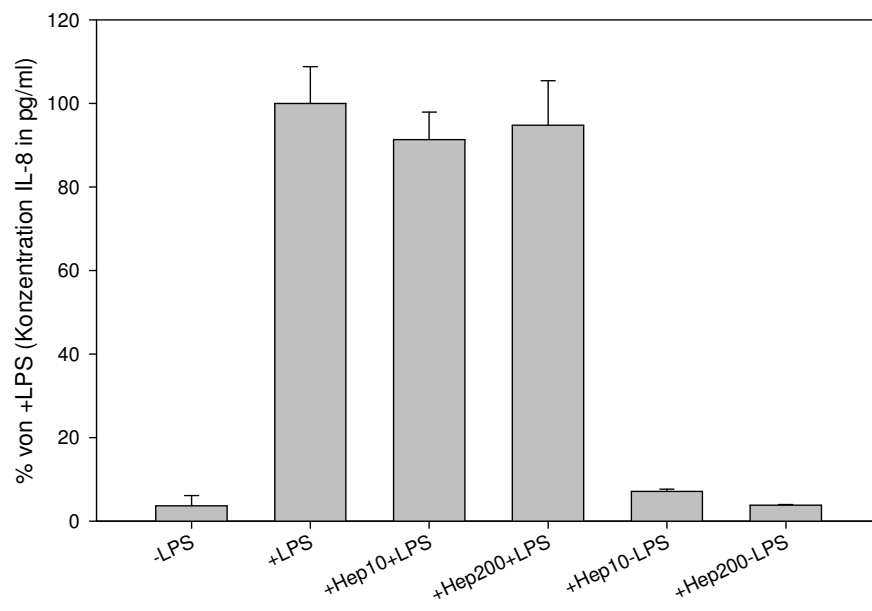
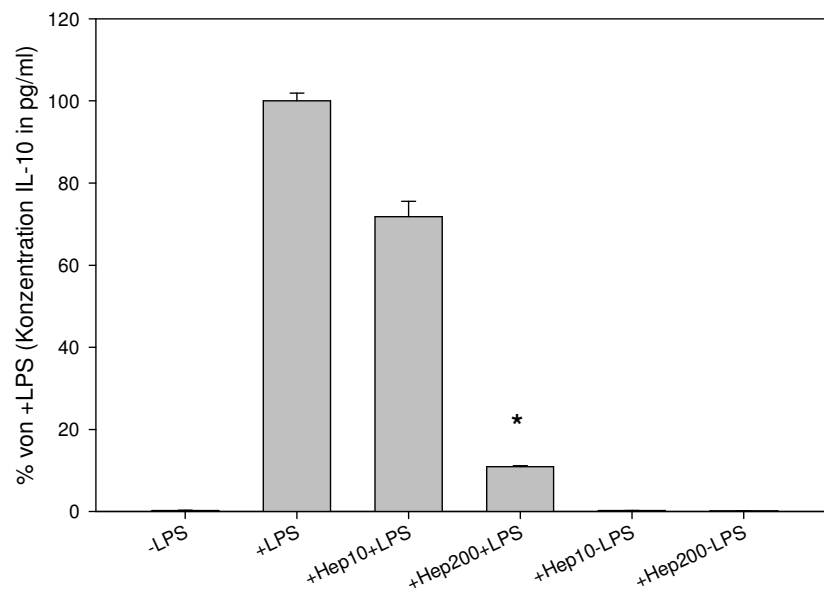
In Abbildung 17A ist zu erkennen, dass 200 I.E./ml Heparin zu einer signifikant verringerten IL-1 β -Produktion durch MonoMac6 Zellen führten. Die IL-8- und TNF α -Synthese zeigte ebenfalls einen Trend zu niedrigeren Werten durch die Zugabe von Heparin. Jedoch lassen bei den Werten für TNF α die 95% Konfidenzintervalle der Mittelwertdifferenzen zwischen Kontrollgruppe und den „Therapiegruppen“ nicht auf einen verändernden Einfluss von Heparin schließen. Bei IL-8 ergab der post-hoc Test

keine signifikanten Abweichungen. Heparin führte ohne LPS-Stimulus zu keiner signifikanten Veränderung der Zytokinproduktion unstimulierter Zellen.

6.3.3.2 Bioplexmessungen

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Überstandsmessungen nach Inkubation mit Heparin dargestellt. Dazu wurden MonoMac6 Zellen zuerst mit 10 bzw. 200 I.E./ml Heparin eine Stunde präinkubiert und dann für 23 Stunden mit 1000 ng/ml LPS stimuliert, oder als Kontrolle unstimuliert gelassen. Die Zytokinbestimmung wurde, wie unter 5.2.4.2 beschrieben, durchgeführt. Aufgrund von Bestimmungen, die im Widerspruch zu den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Bestimmungen standen, wurden hier zweimal drei unabhängige Experimente durchgeführt.



B**C**

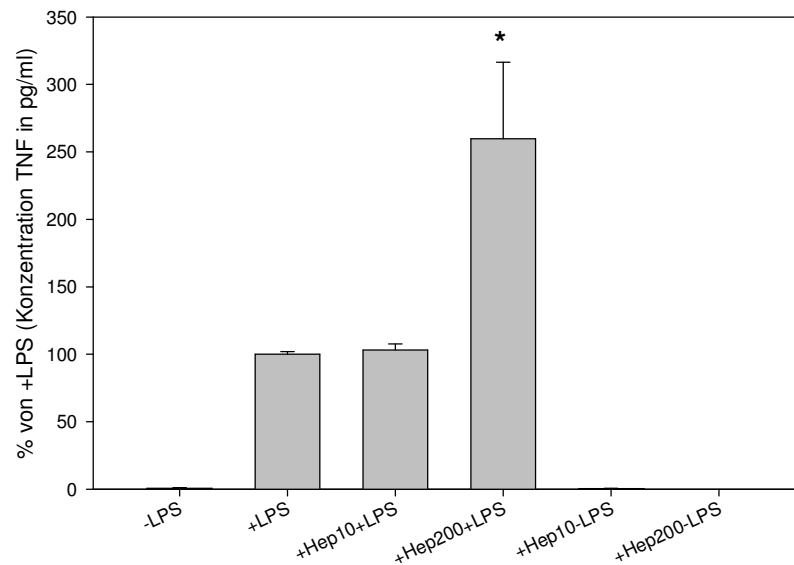
D

Abbildung 18: Bioplex Bestimmung des Einflusses von Heparin (I.E./ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p < 0,05$; ANOVA; $n=3$ für Werte ohne LPS, $n=6$ für Werte mit LPS)

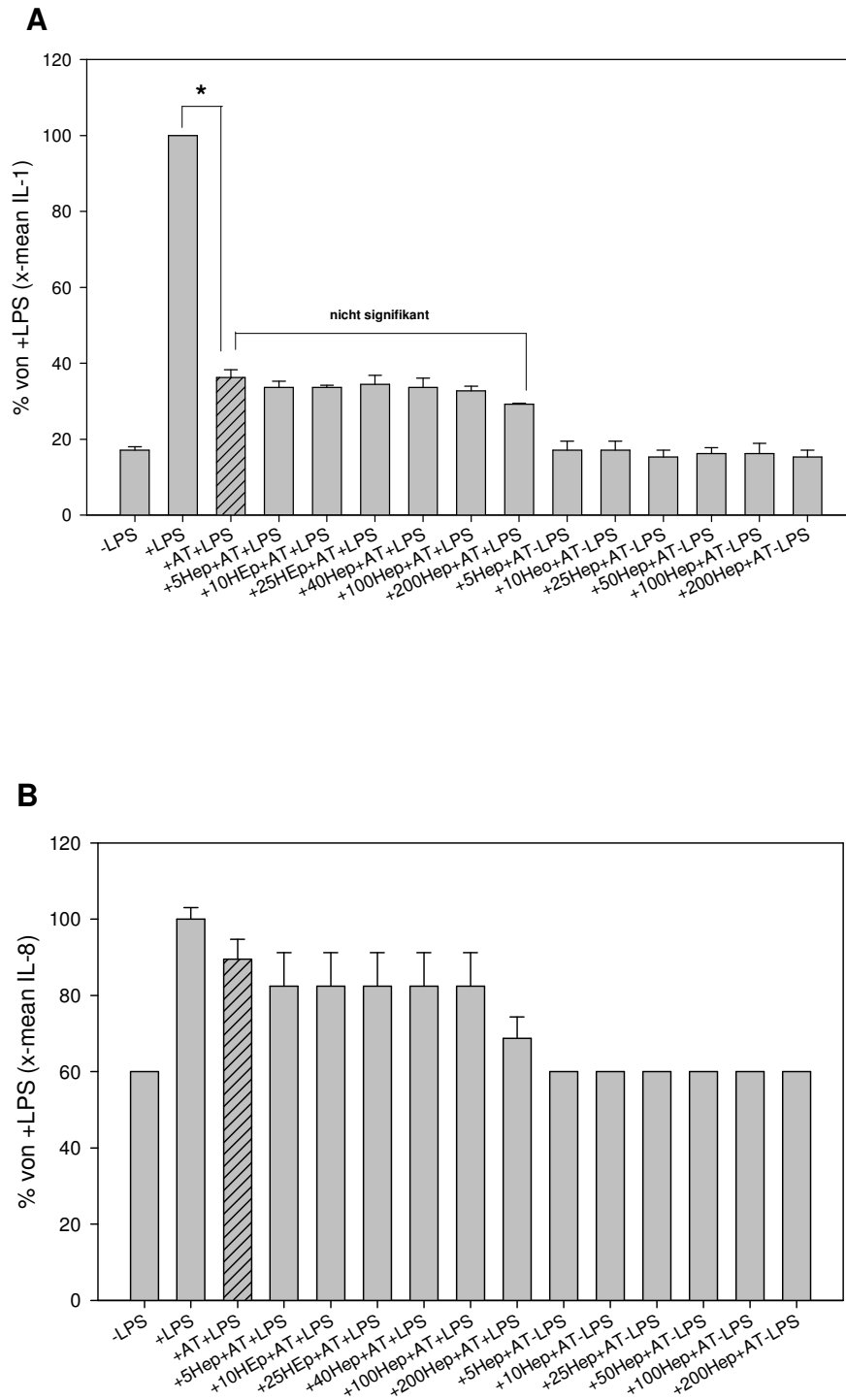
Nach insgesamt 24 Stunden Inkubation mit Heparin zeigte sich eine deutliche Veränderung der Zytokinausschüttung von MonoMac6 Zellen. 200 I.E./ml führten zu einer Erhöhung der TNF α -Konzentration um 160% im Überstand, sowie zu einer um 89% verminderten Ausschüttung von IL-10. Die IL-1 β -Konzentration im Überstand nahm zwar um 21% gegenüber dem Kontrollwert zu, das 95% Konfidenzintervall der Mittelwertdifferenz der Gruppen +LPS oder +200Hep+LPS liegt jedoch bei -48,8 bis +6,2, der Unterschied ist also statistisch nicht relevant. Die IL-8-Produktion blieb unverändert. Heparin alleine führte zu keiner Zytokinsekretion durch unstimulierte Zellen.

6.3.4 Effekt der Kombination aus Antithrombin und Heparin

6.3.4.1 Durchflusszytometrie

Um zu beobachten, ob Heparin die Wirkung von ATIII auf die Zytokinproduktion von MonoMac6 Zellen antagonisieren kann, wie in der Diskussion der KyberSept-Studie[38] immer wieder angeführt, wurden zuerst 5 bis 200 I.E. Heparin mit 20 I.E. ATIII gemischt und 30min. bei 4°C inkubiert. Diese Mischung wurde anschließend auf 1ml Zellsuspension gegeben, für eine Stunde inkubiert und anschließend für vier (IL-1 β , IL-8) bzw. zwei

(TNF α) Stunden mit 1000ng/ml LPS stimuliert. Auch hier dienten unstimulierte Proben als Kontrolle. Die Zytokinsynthese wurde wie unter 5.2.3.3 beschrieben gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.



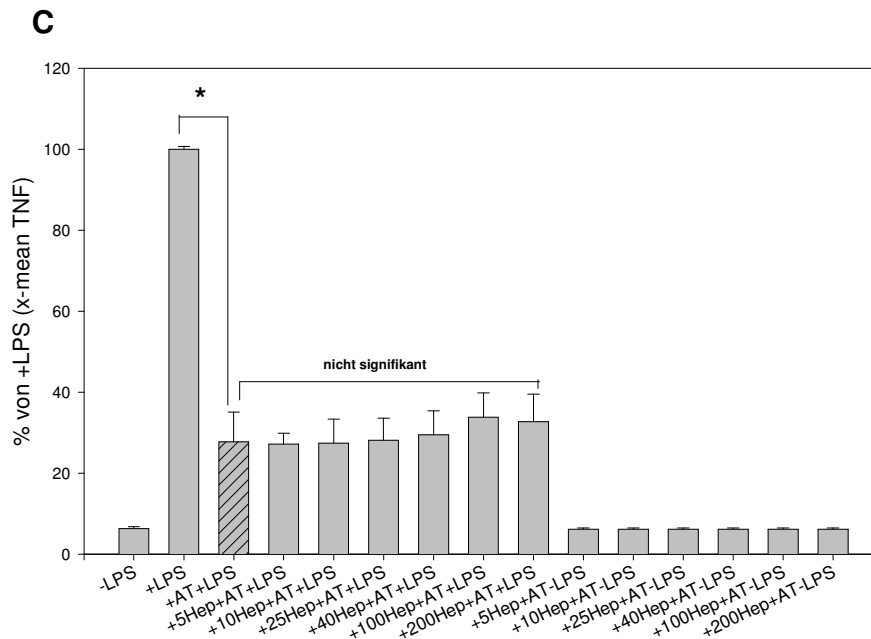


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von ATIII (20I.E./ml) und Heparin (I.E./ml) in Kombination auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p < 0,05$; t-Test; $n=3$) (ANOVA mit +LPS+AT als Kontrollgruppe; $p < 0,05$; $n=3$)

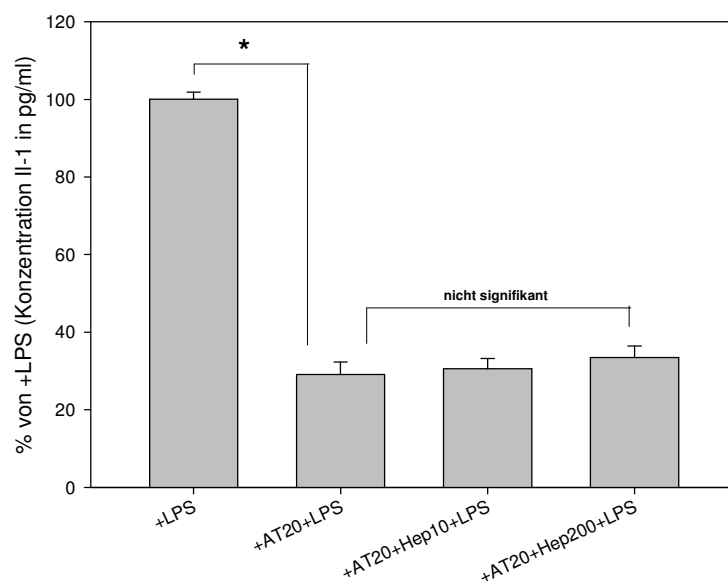
In Abbildung 19 ist wiederum die signifikante Erniedrigung der IL-1 β - und TNF α -Produktion unter Einfluss von 20I.E. ATIII zu erkennen. (vergleiche 6.3.2.1) Die Anwesenheit von Heparin hingegen veränderte diese Wirkung von ATIII nicht signifikant (Kontrollgruppe +AT+LPS durch Muster hervorgehoben). Die IL-8-Synthese von MonoMac6 Zellen, wurde weder von ATIII, noch von der Kombination aus Heparin und ATIII verändert. Unstimulierte Zellen produzierten unter Heparin+ATIII Einfluss nicht vermehrt Zytokine.

6.3.4.2 Bioplexmessungen

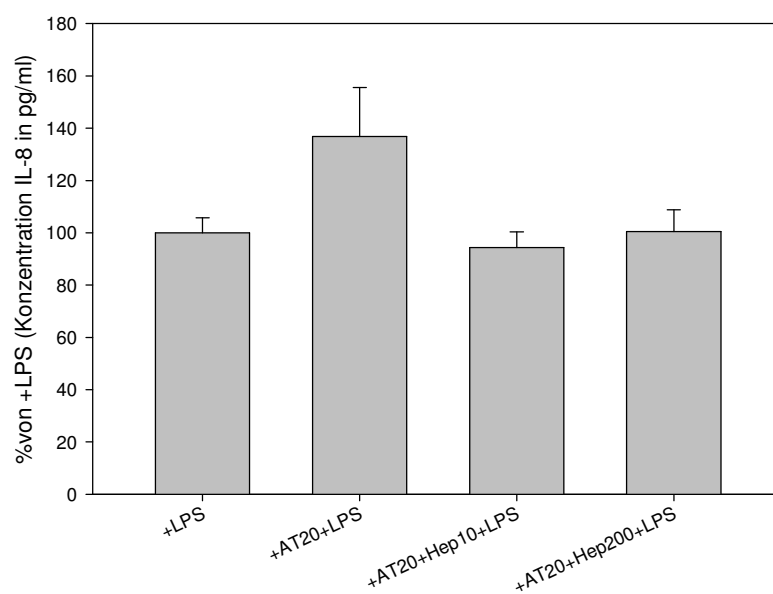
Auch mit der Bioplexmethode wurde der Einfluss von Heparin auf den ATIII-Effekt untersucht. Dazu wurden wiederum 20I.E. ATIII und 10 bzw. 200 I.E. Heparin gemischt, eine Stunde bei 4°C inkubiert und die Mischung auf MonoMac6 Zellen gegeben. Nach einer Stunde Präinkubation wurden 1000ng/ml LPS zugegeben und für weitere 23 Stunden inkubiert. Aufgrund von unter der Nachweisgrenze liegenden Zytokinkonzentrationen sind die Ergebnisse der unstimulierten Kontrollversuche nicht abgebildet. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 20 dargestellt. Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse in den Versuchen mit 20I.E./ml ATIII wurden zweimal drei unabhängige Ansätze durchgeführt.

Zusätzlich wurden für +LPS und +AT20+LPS die Werte aus den Versuchen mit ATIII alleine miteinbezogen.

A



B



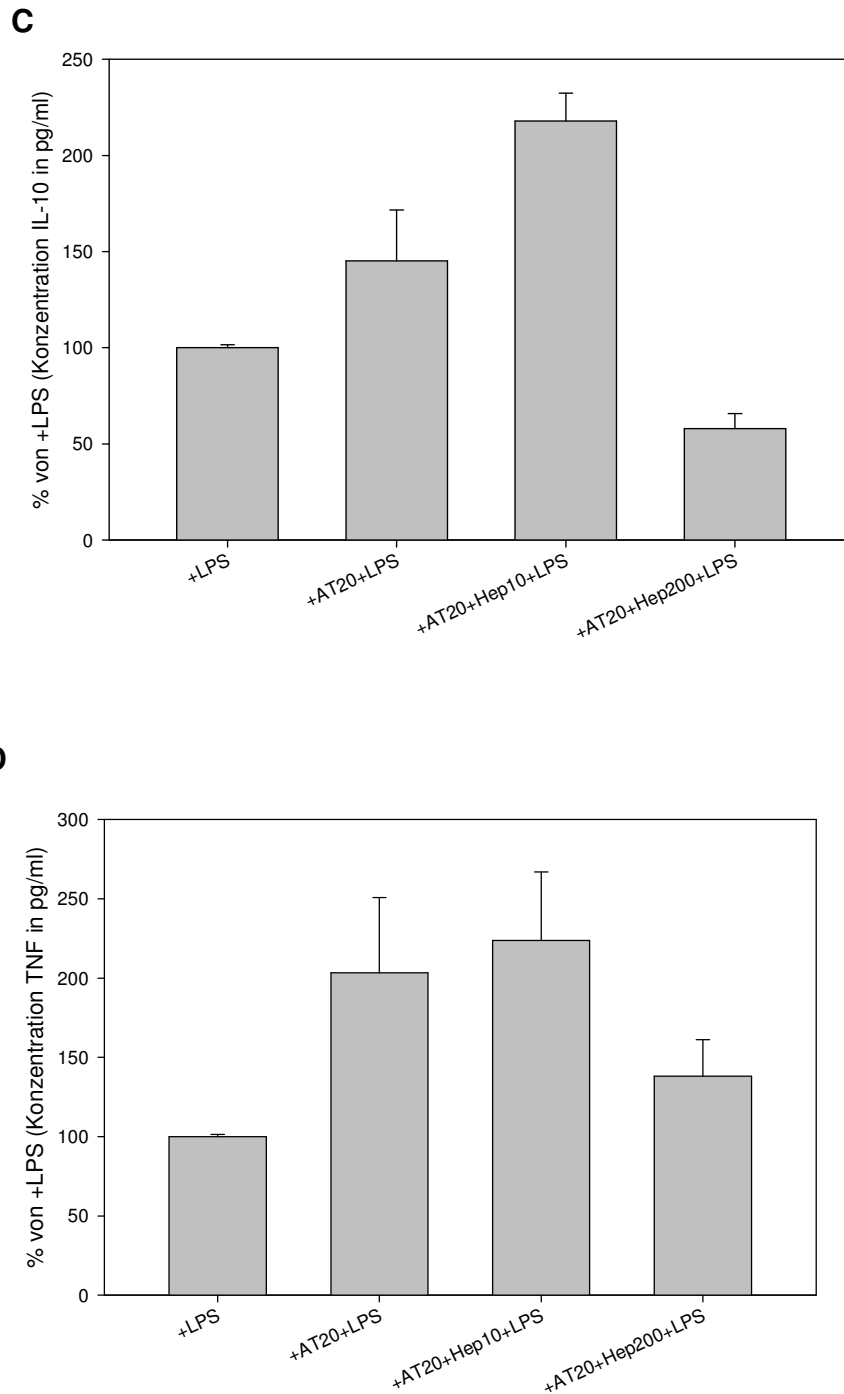


Abbildung 20: Bioplex Bestimmung des Einflusses von ATIII (20I.E./ml) und Heparin (I.E./ml) in Kombination auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p < 0,05$; t-Test; $n=9$) (ANOVA mit +AT20+LPS als Kontrollgruppe; $p < 0,05$; $n=6$ für Werte mit Heparin, $n=9$ für Werte ohne Heparin)

In Abbildung 20A ist wiederum die statistisch signifikante Erniedrigung der IL-1 β -Konzentration durch 20I.E. ATIII erkennbar. Die Zugabe von Heparin veränderte jedoch den Effekt von ATIII auf die Zytokinsekretion der MonoMac6 Zellen nicht.

6.4 Einfluss von aktiviertem Faktor VII auf die LPS induzierte Zytokinantwort von MonoMac6 Zellen

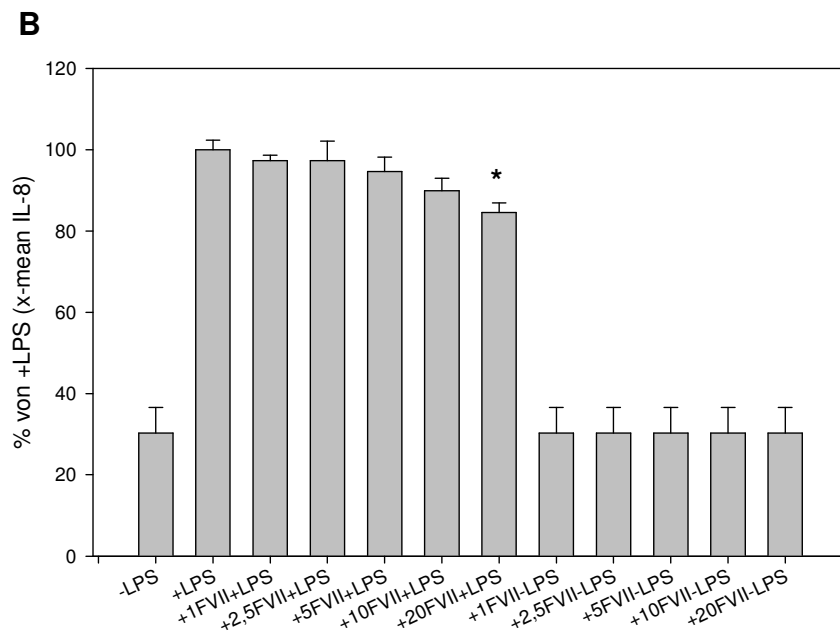
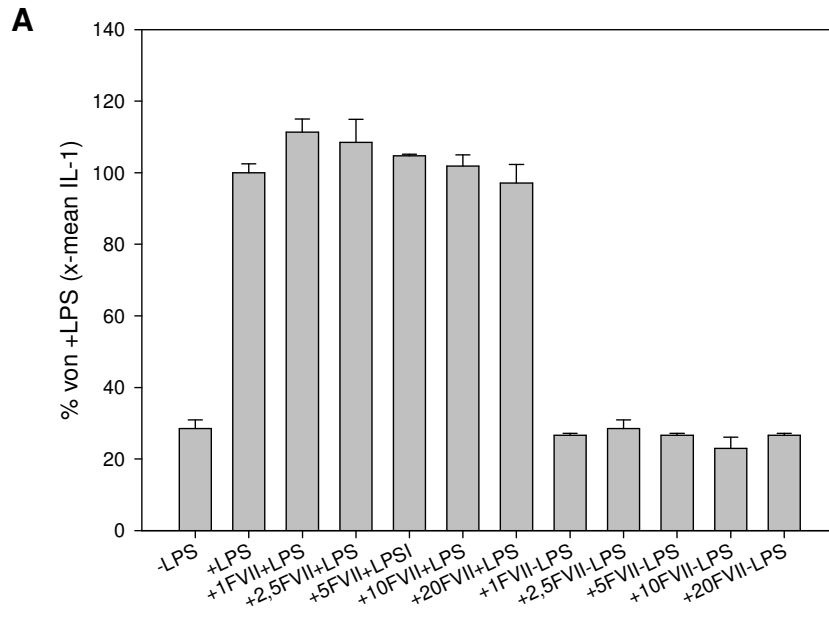
6.4.1 Festlegung der Versuchsabläufe

Die ersten Versuche zur Untersuchung des Effekts von rFVIIa auf die Zytokinantwort von MonoMac6 Zellen wurden nach dem bereits beschriebenen Grundprinzip durchgeführt. Der Standardversuchsaufbau beinhaltet eine Stunde Präinkubation mit rFVIIa, anschließende Zugabe von LPS (1000ng/ml) und Messung der Zytokinproduktion nach weiteren vier Stunden (Durchflusszytometrie) oder 23 Stunden (Bioplex). Für spätere Versuche wurde aufgrund der Ergebnisse der Optimierung (s. 6.1.3) eine Konzentration von 200ng/ml LPS verwendet. In den durchflusszytometrischen Versuchen wurde rFVIIa in fünf verschiedenen Konzentrationen von 1-20µg/ml verwendet, in den Bioplexmessungen wurden nur die Konzentrationen 2,5 und 20µg/ml untersucht. Korrespondierend würde bei der empfohlenen Initialdosis von rFVIIa bei schweren Blutungen mit 90µg/kg KG bei 60ml Blutvolumen pro kg KG und einem Gewicht von 75kg eine Konzentration im Blut von 1,5µg/ml erreicht werden.

6.4.2 Ergebnisse des Standardversuchsaufbaus

6.4.2.1 Durchflusszytometrie

MonoMac6 Zellen wurden eine Stunde mit 1-20µg/ml rFVIIa präinkubiert und anschließend mit 1000ng/ml LPS für vier Stunden stimuliert oder zur Kontrolle unstimuliert gelassen. Die Zytokine wurden, wie unter 5.2.3.3 beschrieben, durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.



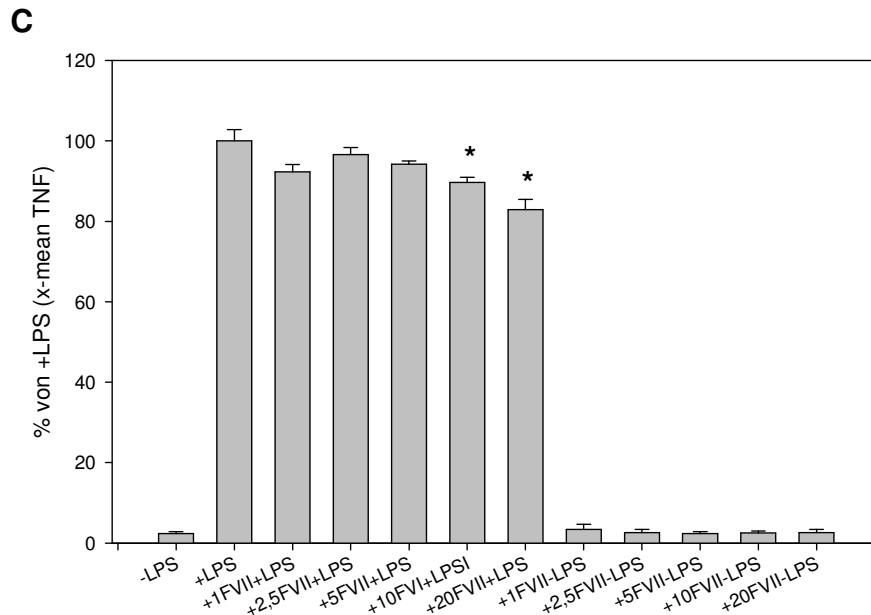
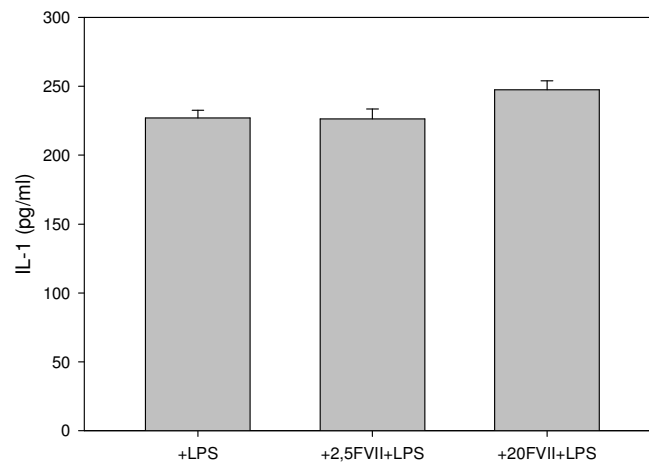
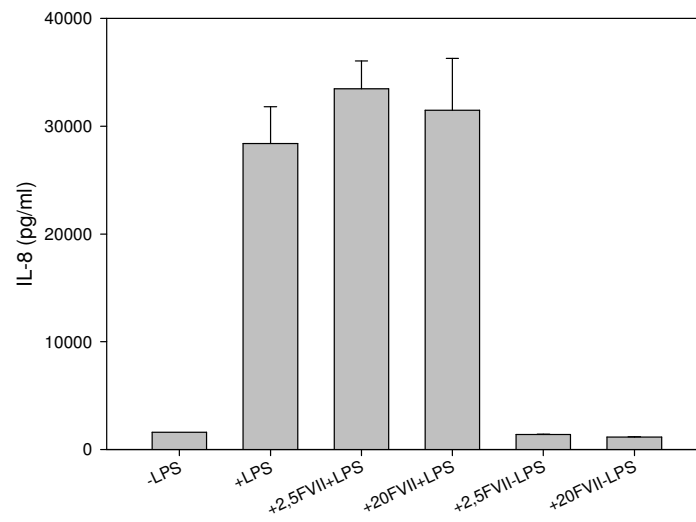
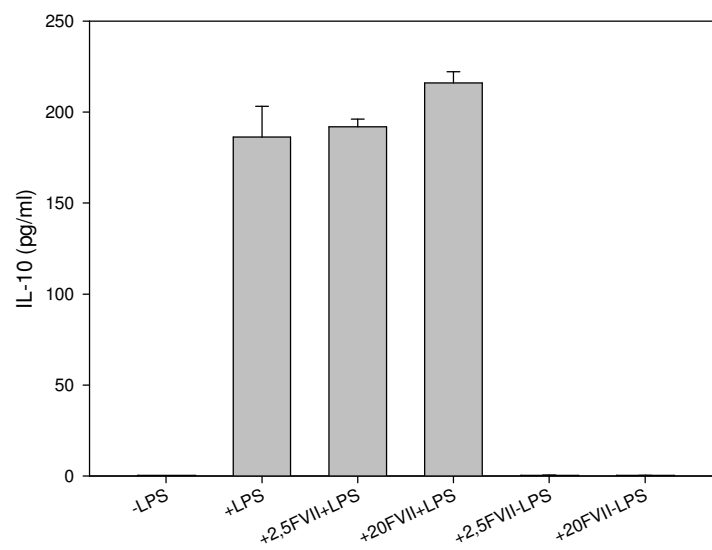


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p < 0,05$; ANOVA, $n=3$)

Die Präinkubation mit rFVIIa führte in den Konzentrationen 10 und 20 $\mu\text{g/ml}$ sowohl zu einer statistisch signifikanten Erniedrigung der LPS-induzierten TNF α -Synthese um 11 bzw. 17% als auch in der Konzentration 20 $\mu\text{g/ml}$ zu einer Verminderung der IL-8-Produktion um 15%. Sonst war kein Effekt feststellbar, weder auf stimulierte, noch auf unstimulierte Zellen.

6.4.2.2 Bioplexmessungen

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Überstandsmessungen nach 24 Stunden Inkubation mit rFVIIa dargestellt. Nach einer Stunde Präinkubation mit 2,5 bzw. 20 $\mu\text{g/ml}$ rFVIIa und anschließender Stimulation mit 1000ng/ml LPS über 23 Stunden wurden die Zytokine, wie unter 5.2.4.2 beschrieben, bestimmt. Als Kontrolle dienten Proben ohne LPS-Stimulus. In Abbildung 22A sind nur die Ergebnisse der Versuche mit LPS Zugabe dargestellt, da die Werte ohne LPS-Zugabe unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

A**B****C**

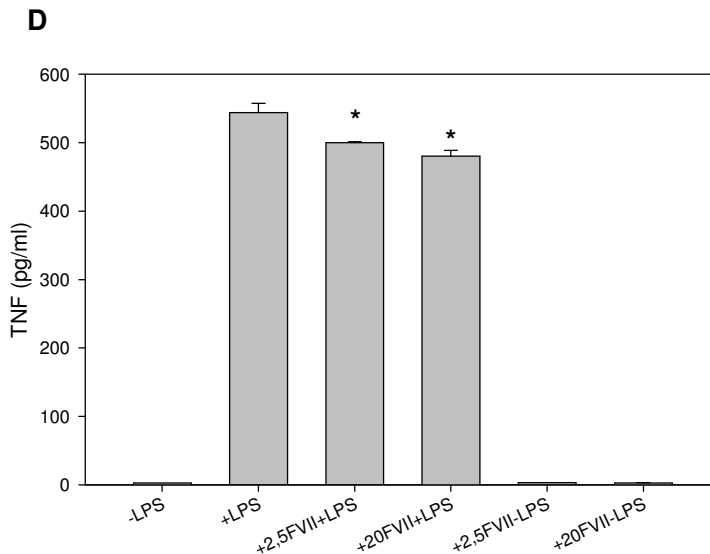


Abbildung 22: Bioplex Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p < 0,05$; ANOVA, $n=3$)

Die TNF α -Ausschüttung wurde durch rFVIIa in beiden untersuchten Konzentrationen signifikant vermindert. Dabei zeigte sich unter 2,5 $\mu\text{g/ml}$ rFVIIa eine Reduktion um 8%, durch 20 $\mu\text{g/ml}$ rFVIIa eine Reduktion um 12%. Die anderen gemessenen Zytokine blieben unverändert. Außerdem führte rFVIIa zu keiner Erhöhung der Zytokinkonzentration im Überstand ohne Zugabe von LPS.

6.5 Wird der immunmodulatorische Effekt von aktiviertem Faktor VII auf MonoMac6 Zellen durch tissue factor vermittelt?

6.5.1 Oberflächenexpression von tissue factor unter Einfluss verschiedener Stimuli

Mit dem Ziel eine relevante Expression des Proteins tissue factor auf der Zelloberfläche zu erzielen wurden MonoMac6 Zellen und PBMCs von gesunden Probanden mit verschiedenen Stimuli inkubiert. Anschließend wurde die TF-Oberflächenexpression, wie unter 5.2.3.2 beschrieben, gemessen und die Kinetik der Expression bestimmt. Bei den Versuchen mit PBMCs wurden nur CD14+ Zellen betrachtet. Die Ergebnisse der Versuche mit MonoMac6 Zellen sind in Abbildung 23, die der Versuche mit PBMCs in Abbildung 24 dargestellt.

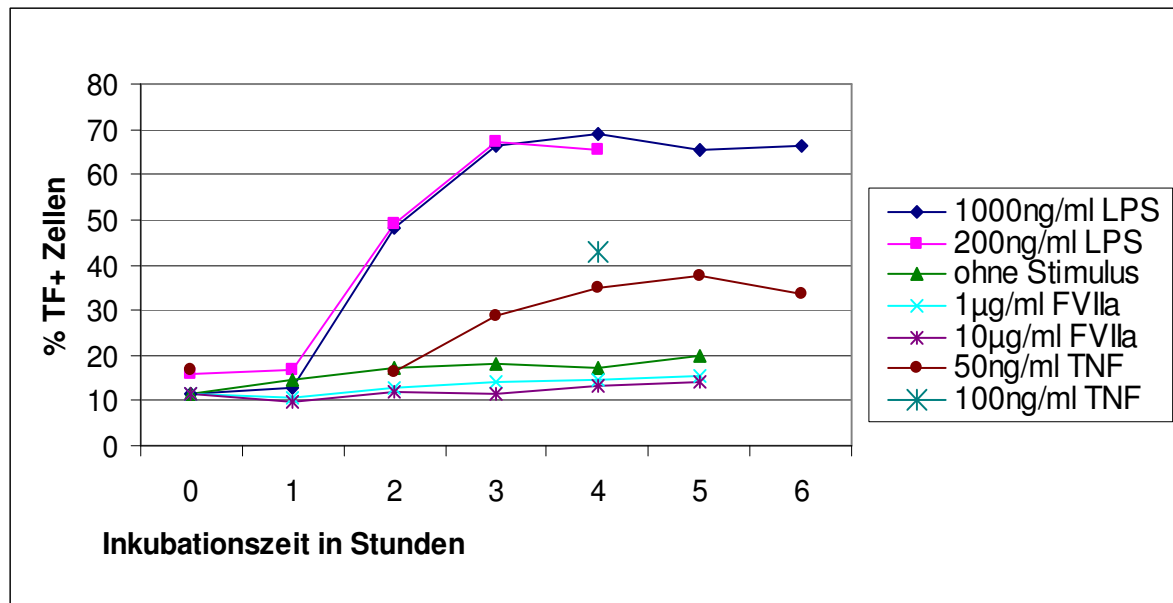


Abbildung 23: Oberflächenexpression von TF auf MonoMac6 Zellen nach der jeweiligen Inkubationszeit in Stunden mit den angegebenen Stimuli (n=1)

Eine Inkubation mit 200 bzw. 1000ng/ml LPS ergab gleichwertige Ergebnisse an TF+ MonoMac6 Zellen. In der Kinetik zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Expression nach einer Stimulation von 2h. LPS führte zu einer messbaren TF-Expression auf bis zu 70% der Zellen. Bei diesem Wert wurde eine Plateauphase erreicht.

Bei Stimulation mit TNF α konnte dosisabhängig der Anteil der TF+ Zellen gesteigert werden. Ein deutlicher Anstieg wurde hier aber erst später, nach 3h Inkubation, beobachtet. In dem vorgelegten Ansatz konnten selbst mit einer Dosierung von 100ng/ml nur knapp über 40% positive Zellen erreicht werden.

Ohne Stimulus erhöhte sich die Expression minimal, was auf eine geringfügige Aktivierung durch Adhäsion schließen lässt. Die Inkubation mit rFVIIa führte zu Werten, die denen ohne Stimulus vergleichbar sind, woraus abgeleitet werden kann, dass FVII seinen eigenen Rezeptor nicht induziert.

Basierend auf den Konzentrationen der Versuchsreihe mit MonoMac6 Zellen wurde der Effekt auf die TF-Expression in humanen PBMCs beobachtet. Dafür wurden als Stimuli LPS in einer Konzentration von 200ng/ml sowie TNF α 100ng/ml gewählt. Abbildung 24 zeigt die Kinetik der TF-Expression von CD14+ PBMCs, welche durch eine Inkubation mit TNF α selbst über 24 Stunden nicht merklich erhöht werden konnte. Auch die Stimulation mit LPS führte zu einem geringeren Anteil TF+ Zellen (ca.55%), als bei den Versuchen mit MonoMac6 Zellen.

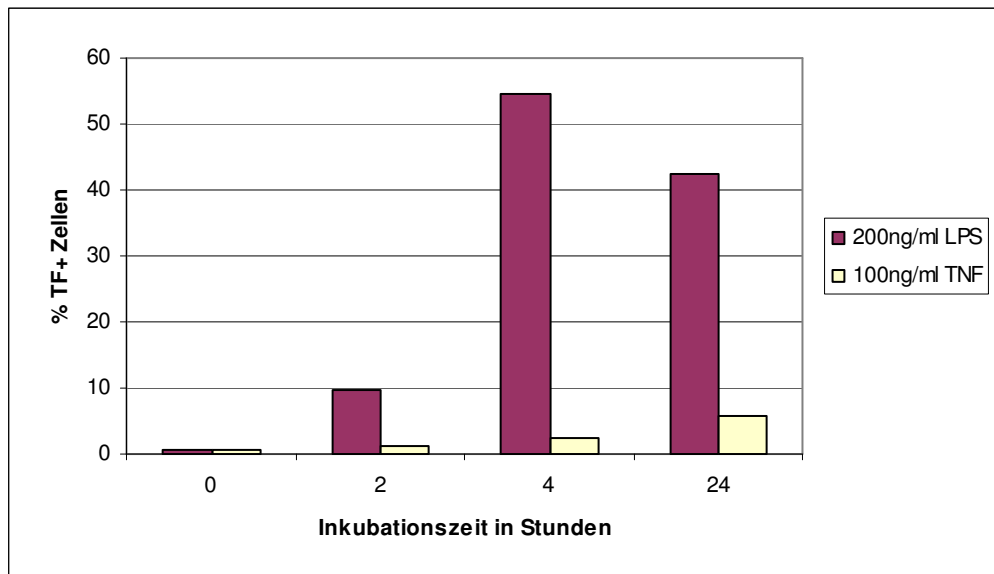


Abbildung 24: Oberflächenexpression von TF auf CD14+ PBMCs von einem gesunden Probanden nach der jeweiligen Inkubationszeit mit 200ng/ml LPS oder 100ng/ml TNF α .

6.5.2 Festlegung weiterer Versuchsabläufe

Da TF nicht nur als Rezeptor für FVIIa bezüglich der koagulatorischen Wirkung gesehen wird sondern auch als möglicher Signaltransduktor für dessen immunmodulatorische Wirkung, spielt die Oberflächenexpression von TF während der Inkubation mit rFVIIa eventuell eine entscheidende Rolle. Deshalb wurden mit Hilfe der obigen Vorversuche drei weiterführende Experimente entwickelt, bei denen die verwendeten Zellen mit LPS oder TNF α vorbehandelt wurden um die TF-Expression anzuregen. Außerdem wurde die LPS Konzentration aufgrund der Ergebnisse der Optimierung (s. 6.1.3) in allen Versuchen auf 200ng/ml reduziert. Wie in den Optimierungsversuchen bereits erwähnt, ist die Änderung der LPS-Konzentration für die IL-1 β und IL-8 Produktion unerheblich, nur für TNF α erhält man quantitativ höhere Werte für die intrazellulär messbare Zytokinsynthese. Beide Konzentrationen führen jedoch zu einer starken Aktivierung der Zellen, wobei sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung der Zytokinproduktion durch das zu untersuchende Agens noch möglich sind. Die Versuchsergebnisse sind jeweils im Verhältnis zu der an diesem Tag mit der verwendeten LPS-Konzentration möglichen Zytokinproduktion dargestellt, was eine qualitative Vergleichbarkeit der Versuche gewährleistet.

Im ersten Versuchsaufbau wurde zur Steigerung der TF-Expression für eine Stunde mit 200ng/ml LPS präinkubiert. Danach wurde rFVIIa und Brefeldin zugefügt, weitere drei Stunden inkubiert und die Zytokinsynthese durchflusszytometrisch erfasst. (s. 6.5.3.1 Präinkubation mit LPS) Dadurch tritt schon eine Stunde nach Zugabe von rFVIIa eine

Erhöhung der TF-Expression auf. Die Stimulationszeit mit LPS ist mit vier Stunden konsistent mit dem Standardversuch. Nur durch die Zugabe von Brefeldin als Sekretionsinhibitor sind die Zytokine intrazellulär bestimmbar. Fügt man Brefeldin erst zusammen mit rFVIIa zu, wird die Zytokinproduktion die nicht unter dem Einfluss von rFVIIa steht, nämlich die Präinkubationszeit mit LPS, aus dem Experiment ausgeschlossen. Dieser Ausschluss eines Teils der Inkubationszeit ist bei der kumulativen Messung im Kulturüberstand nicht möglich, weshalb diese Experimente nicht mit dem Bioplex-System durchgeführt wurden.

Die zweite Versuchsreihe enthält, zusätzlich zum zeitlichen Ablauf des Standardversuchs (s. 6.4.2), eine vierstündige Vorbehandlung mit 100ng/ml TNF α zur Induktion der TF-Expression (s. 6.5.3.2 Vorbehandlung mit TNF α). Die Zellen wurden also zuerst vier Stunden mit TNF α behandelt und dann mit PBS gewaschen um überschüssiges TNF α zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen erneut ausgesät und standardmäßig eine Stunde mit rFVIIa präinkubiert und dann mit 200ng/ml LPS für vier Stunden stimuliert. Für diesen Ansatz wurde zusätzlich eine Messung der Zytokine im Kulturüberstand mittels Bioplexmessung durchgeführt. Proben ohne LPS-Stimulus, aber mit TNF α -Vorbehandlung dienten als Kontrollen.

Als dritter Ansatz wurden MonoMac6 Zellen drei Stunden mit 200ng/ml LPS vorbehandelt um TF auf den Zellen zu induzieren, dann die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die TF-exprimierenden Zellen unter Zugabe von Brefeldin zwei Stunden mit rFVIIa ohne weiteren LPS-Stimulus inkubiert. Die Inkubationszeit mit LPS wurde anhand der Optimierungsversuche zur Induktion von TF festgelegt, wo nach drei Stunden das Maximum erreicht wurde. Die Zytokinsynthese wurde durchflusszytometrisch erfasst. (s. 6.5.3.3 Vorbehandlung mit LPS). Da der Einfluss einer Substanz auf die intrazellulär messbare de-novo-Synthese der Zytokine sehr schnell erkennbar ist, wurde die Inkubation der TF-exprimierenden Zellen mit rFVIIa auf zwei Stunden festgelegt. Dieser Versuchsaufbau wurde durchgeführt um die Vergleichbarkeit zu vorhandener Literatur zu gewährleisten. Der Versuchsablauf der Experimente von Muth et al.[65] wurde an das in der vorgelegten Arbeit verwendete Zellkulturmodell angepasst. Da diese Experimente nicht das vorrangige Interesse der vorgelegten Arbeit betreffen, nämlich die Veränderung der LPS-induzierten Zytokinproduktion zu betrachten, sondern sich mit der Reaktion LPS-vorbehandelter Zellen auf rFVIIa befassen, wurden diese Versuche nur mit der durchflusszytometrischen Messmethode durchgeführt.

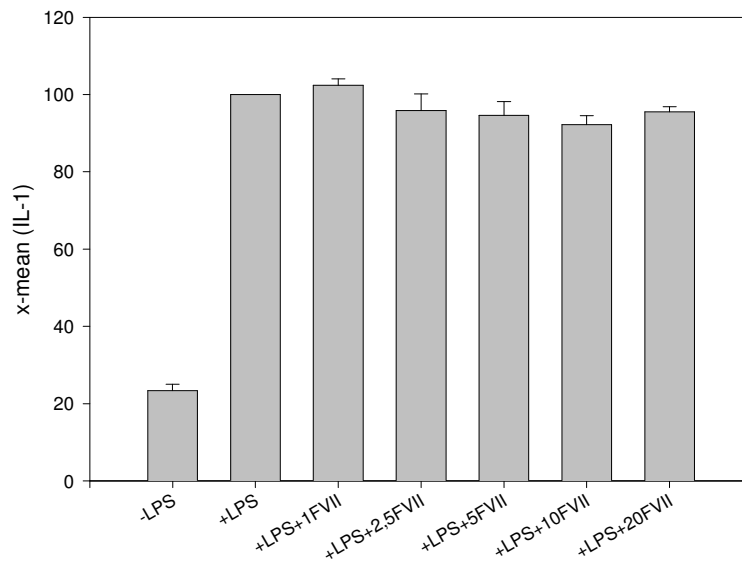
Zusätzlich wurden MonoMac6 Zellen mit dem TF-Gen transfiziert um eine erhöhte TF-Oberflächenexpression ohne gleichzeitigen entzündlichen Stimulus zu erreichen. (s.6.5.4 Versuche mit transfizierten Zellen)

6.5.3 Ergebnisse der Versuche mit vorbehandelten Zellen

6.5.3.1 Präinkubation mit LPS

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Versuche mit LPS-Präinkubation dargestellt. Dabei wurden MonoMac6 Zellen eine Stunde mit 200ng/ml LPS präinkubiert, anschließend rFVIIa (1-20µg/ml) und Brefeldin zugegeben und weitere drei Stunden inkubiert. Die Zytokine wurden, wie unter 5.2.3.3 beschrieben, bestimmt.

A



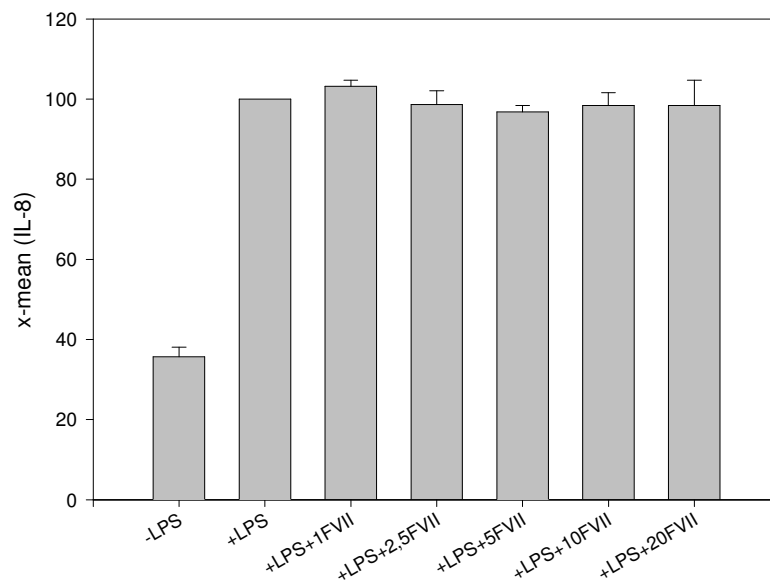
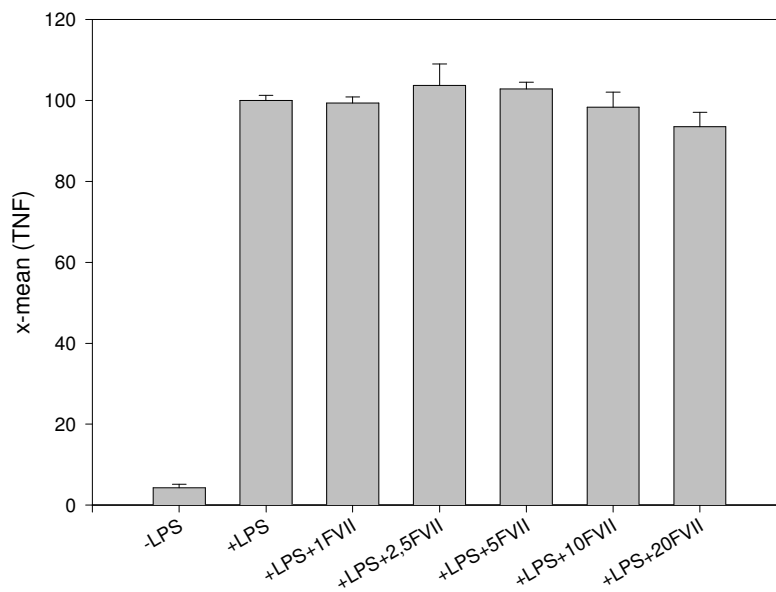
B**C**

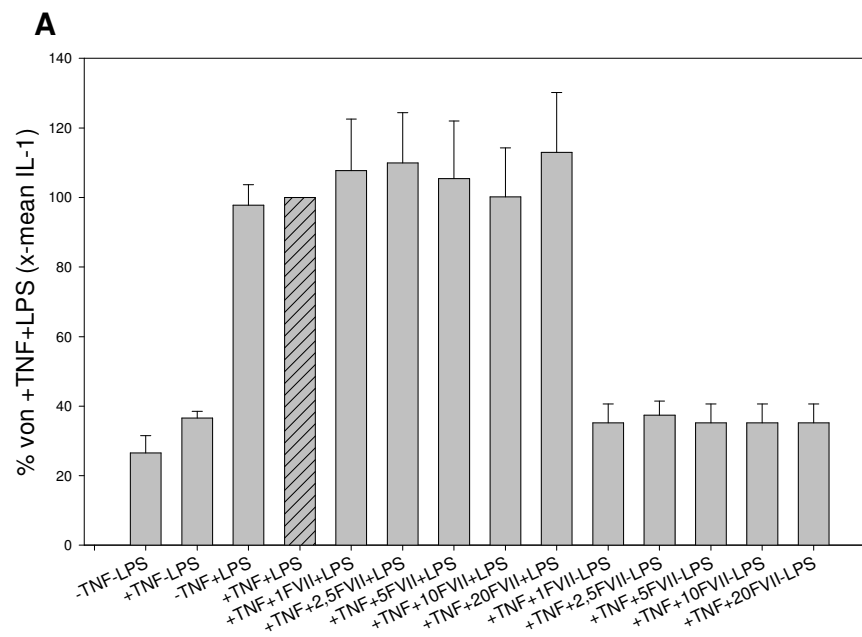
Abbildung 25: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen nach LPS Präinkubation (+LPS=200ng/ml) (ANOVA mit +LPS als Kontrollgruppe; $p < 0,05$; $n=3$)

rFVIIa hatte in diesem Versuchsmodell keinerlei Einfluss auf die LPS-induzierte Zytokinsynthese der MonoMac6 Zellen.

6.5.3.2 Vorbehandlung mit TNF α

6.5.3.2.1 Durchflusszytometrie

Nach einer vierstündigen Vorbehandlung mit 100ng/ml TNF α , wurden die MonoMac6 Zellen mit PBS gewaschen und erneut ausgesät. Anschließend wurden Brefeldin und rFVIIa in den angegebenen Konzentrationen zugegeben und eine Stunde später 200ng/ml LPS zugefügt oder zur Kontrolle weggelassen. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmungen nach weiteren vier Stunden Inkubationszeit sind in Abbildung 26 dargestellt.



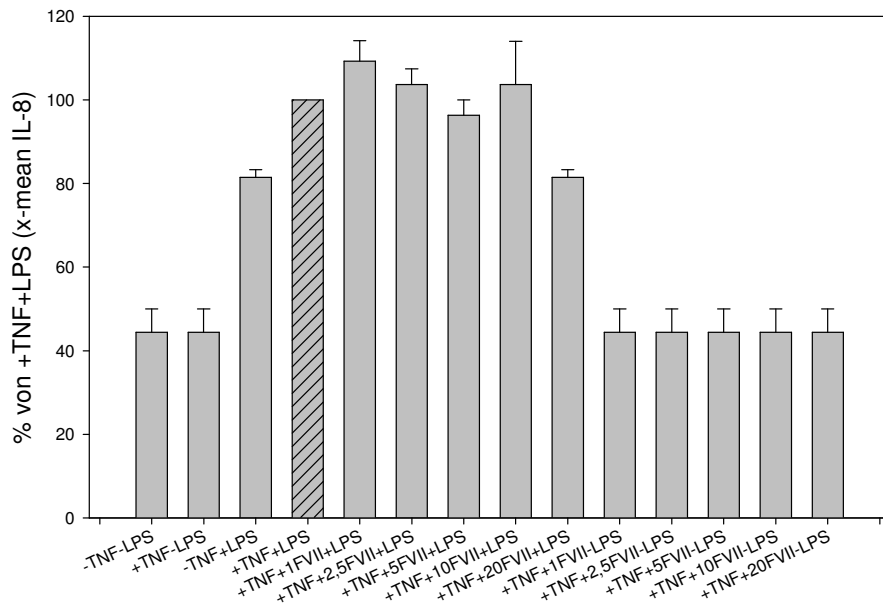
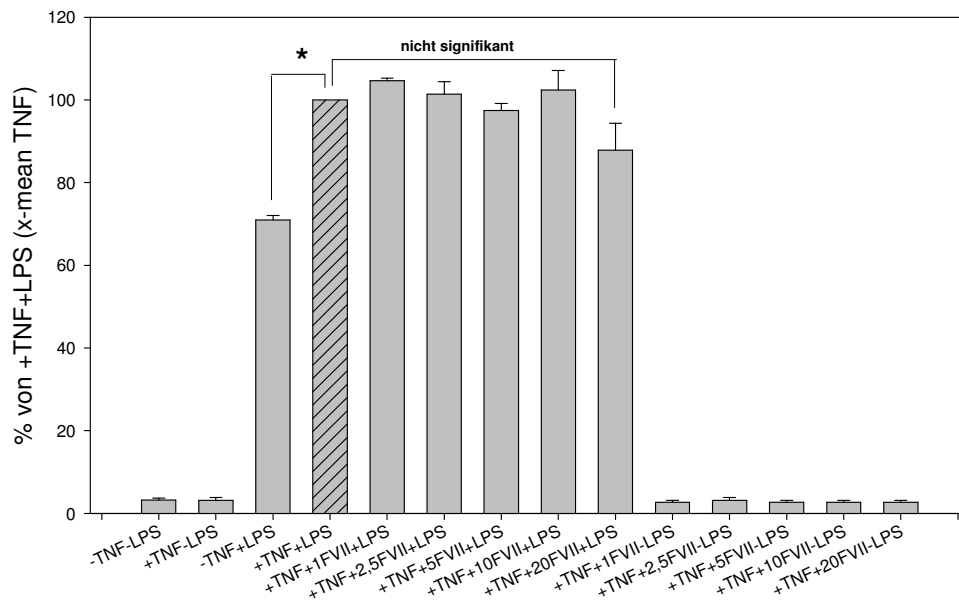
B**C**

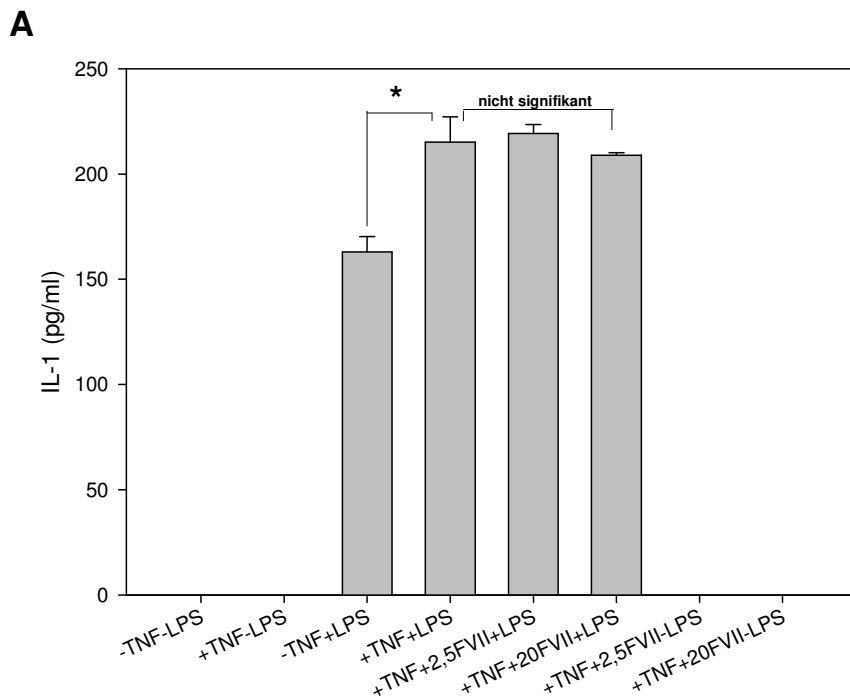
Abbildung 26: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen nach TNF α Vorbehandlung (+TNF=100ng/ml; +LPS=200ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p < 0,05$, t-Test, $n=3$) (ANOVA mit +TNF+LPS als Kontrollgruppe; $p < 0,05$; $n=3$)

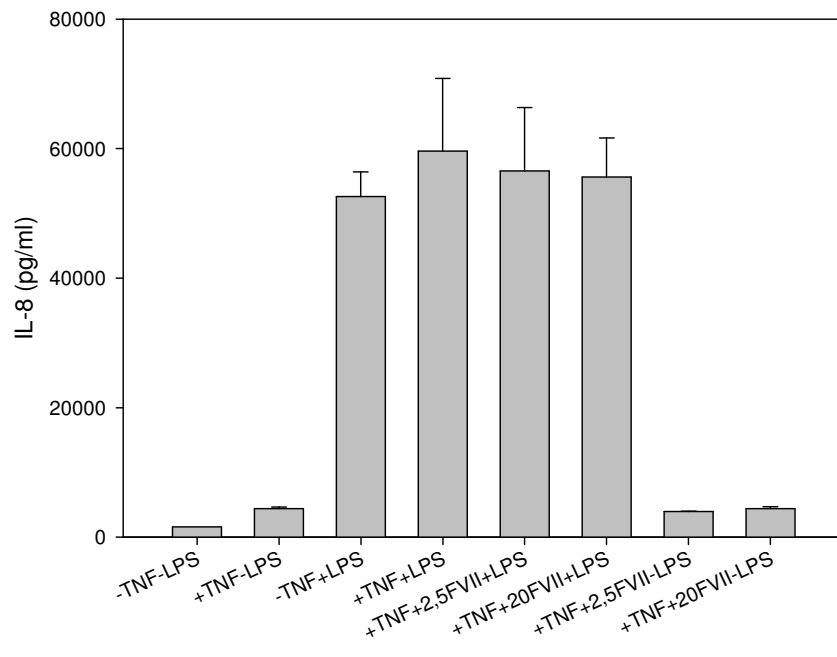
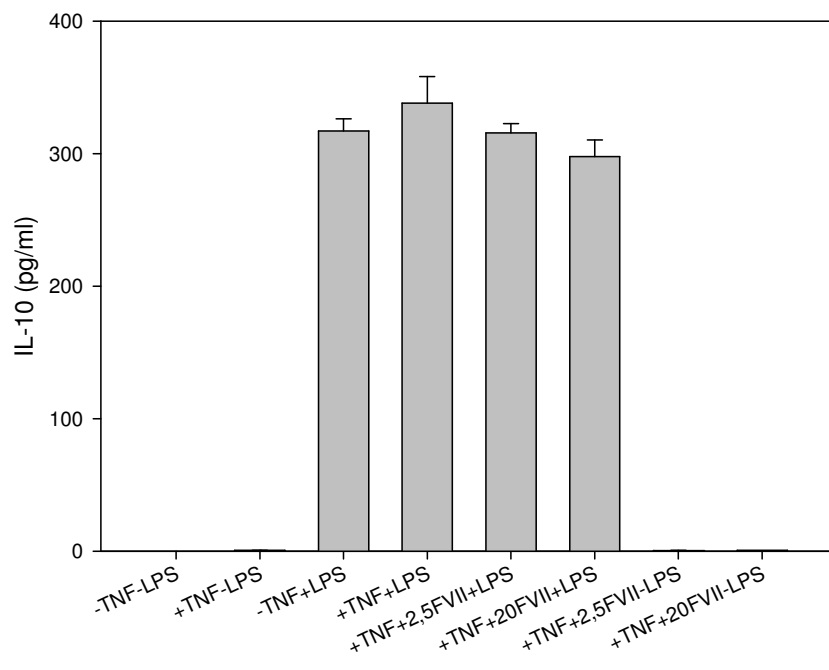
Die Vorbehandlung der Zellen mit TNF α ergab eine um 42% erhöhte Stimulierbarkeit durch LPS für TNF α . (Abbildung 26C) Die Zugabe von rFVIIa veränderte jedoch die

Produktion der gemessenen Zytokine durch MonoMac6 Zellen im Vergleich zu der alleinigen Stimulation mit TNF α +LPS (durch Muster hervorgehoben) nicht signifikant. Die Zugabe von rFVIIa alleine zu mit TNF α vorbehandelten Zellen (+TNF+FVII-LPS) führte zu keiner Zytokinsynthese.

6.5.3.2.2 Bioplexmessungen

Auf gleiche Weise vorbehandelte Zellen wurden auch für die Bioplexmessmethode verwendet. Dazu wurden diese ebenfalls nach TNF α Behandlung mit PBS gewaschen und anschließend mit 2,5 bzw. 20 μ g/ml rFVIIa versetzt. Nach einer Stunde wurden zusätzlich 200ng/ml LPS zugefügt, oder zur Kontrolle ohne Stimulus gearbeitet, und nach weiteren 23 Stunden die Zytokine aus dem Zellkulturüberstand, wie unter 5.2.4.2 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.



B**C**

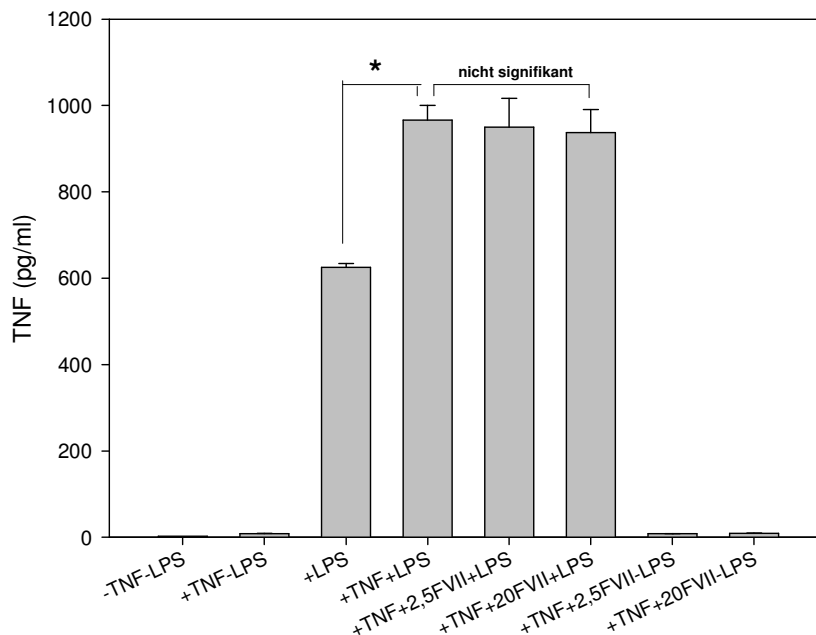
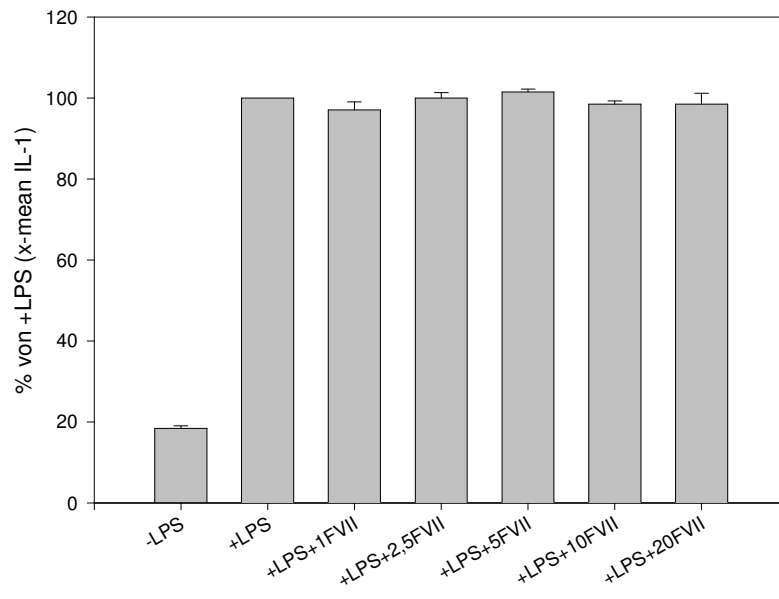
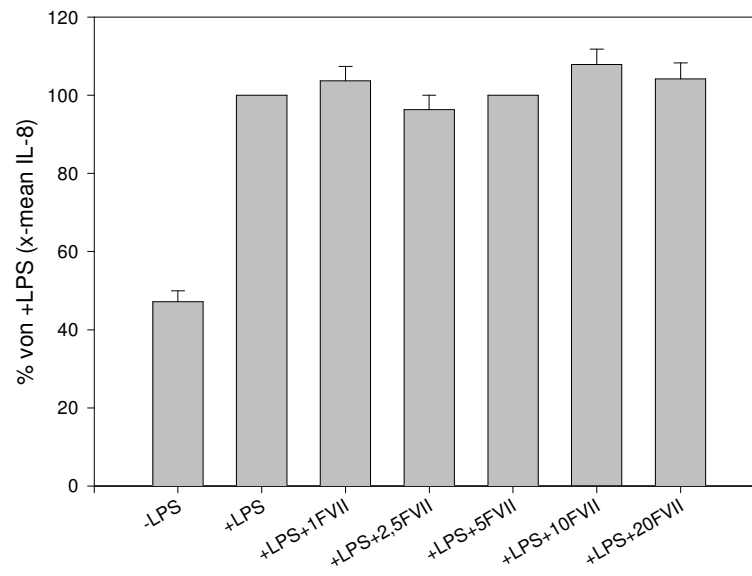
D

Abbildung 27: Bioplex Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen nach TNF α Vorbehandlung (+TNF=100ng/ml; +LPS=200ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p<0,05$; t-Test, $n=3$) (ANOVA mit +TNF+LPS als Kontrollgruppe; $p<0,05$; $n=3$)

In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass, im Vergleich zu MonoMac6 mit LPS alleine, die Vorbehandlung mit TNF α zu einer erhöhten Stimulierbarkeit der MonoMac6 Zellen durch LPS bezüglich IL-1 β und TNF α führte. So stieg die IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand um 32%, die TNF α -Konzentration sogar um 54% im Vergleich zur Stimulation mit LPS alleine. Außerdem führte die Vorbehandlung mit TNF α zu einer geringen IL-8- und TNF α -Produktion der MonoMac6 Zellen ohne Zugabe von LPS. Die Zugabe von rFVIIa jedoch veränderte die Konzentrationen der vier gemessenen Zytokine im Vergleich zur Stimulation mit TNF α alleine bzw. mit TNF α +LPS in Kombination nicht.

6.5.3.3 Vorbehandlung mit LPS

Um zu untersuchen, ob mit LPS vorstimulierte Zellen auf rFVIIa mit veränderter Zytokinsynthese reagieren, wurden MonoMac6 Zellen mit 200ng/ml LPS für drei Stunden stimuliert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit 1-20 $\mu\text{g/ml}$ rFVIIa für zwei Stunden inkubiert. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zytokinbestimmung sind in Abbildung 28 dargestellt.

A**B**

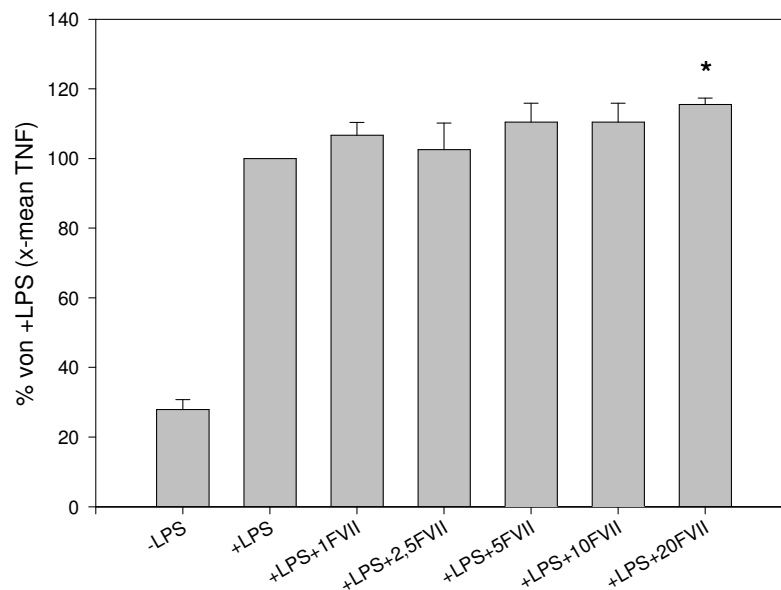
C

Abbildung 28: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen nach LPS Vorbehandlung (+LPS=200ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p < 0,05$; ANOVA, $n=3$)

Unter dem Einfluss von 20 $\mu\text{g/ml}$ rFVIIa war eine um 16% erhöhte TNF α -Produktion zu erkennen. Die IL-1 β - und die IL-8-Synthese blieben unverändert. Die IL-8 Synthese erscheint zwar beispielsweise unter dem Einfluss von 10 $\mu\text{g/ml}$ rFVIIa um 7% erhöht, aber das 95% Konfidenzintervall liegt zwischen -24,9 und +9,1, weshalb hier kein relevanter Unterschied besteht.

6.5.4 Versuche mit transfizierten Zellen

6.5.4.1 Überprüfung der Transfektion

6.5.4.1.1 Western Blot

Zur Überprüfung der TF-Expression der transfizierten Zellen wurde ein Western Blot durchgeführt. Dabei wurden herkömmliche MonoMac6 Zellen, TF-transfizierte MonoMac6 Zellen und LPS-stimulierte MonoMac6 Zellen (1000ng/ml LPS; vier Stunden Inkubationszeit) verglichen. In Abbildung 29 ist das Ergebnis abgebildet.

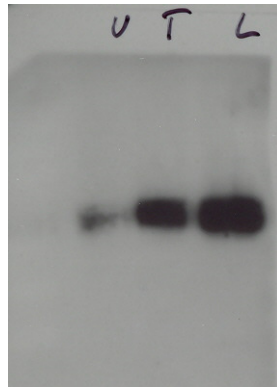


Abbildung 29: Ergebnis des Western Blots; U=unbehandelte MonoMac6 Zellen, T=transfizierte Zellen, L=LPS-stimulierte Zellen

Es ist deutlich zu erkennen, dass die transfizierten Zellen mehr Protein exprimieren, als unbehandelte MonoMac6 Zellen, jedoch nicht so viel, wie LPS-stimulierte Zellen.

6.5.4.1.2 Tissue factor-Aktivität und Oberflächenexpression von MonoMac6 Zellen und TF-transfizierten Zellen

Zum Vergleich der TF-Aktivität von transfizierten Zellen, MonoMac6 Zellen und LPS-stimulierten MonoMac6 Zellen (Inkubationszeit 4h, LPS-Konzentration: 200ng/ml) wurden jeweils, wie unter 5.2.7 beschrieben, Zelllysate hergestellt und die Aktivität gemessen. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 30 dargestellt.

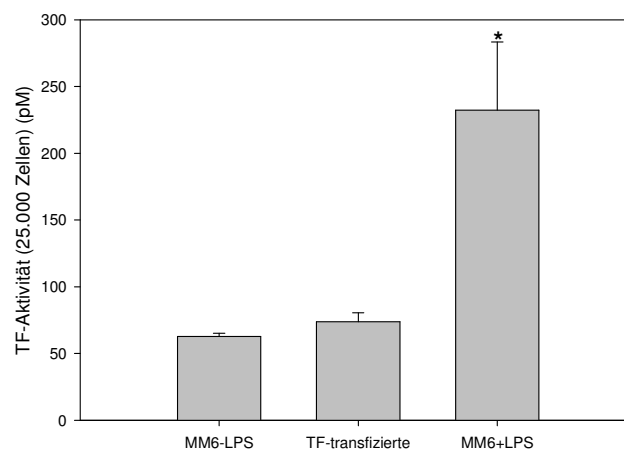


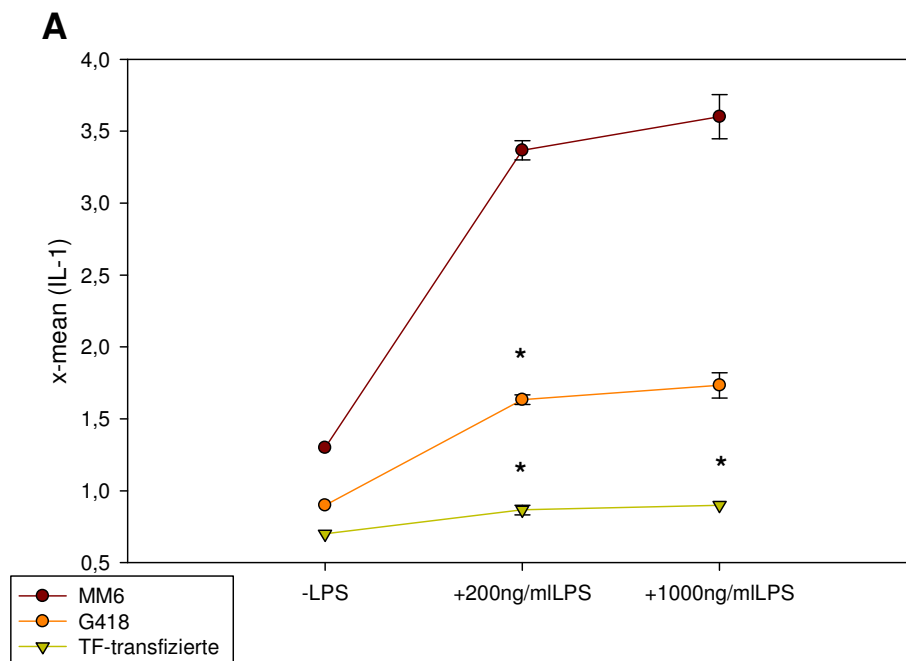
Abbildung 30: Vergleich der TF-Aktivität von unstimulierten und LPS-stimulierten MonoMac6 (MM6) Zellen, sowie der TF-transfizierten Zellen (+LPS=200ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu MM6-LPS; $p < 0,05$; ANOVA, $n=3$)

In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass die transfizierten Zellen lediglich eine minimal erhöhte TF-Aktivität gegenüber den nicht transfizierten MonoMac6 Zellen hatten. Der

Unterschied zwischen den beiden Zelllinien ist statistisch nicht signifikant. Lediglich die LPS-Stimulation führte zu einer signifikanten Erhöhung der TF-Aktivität um das 3,7fache. Die Oberflächenexpression der TF-transfizierten Zellen war mit durchschnittlich 17,3% TF+ Zellen nur geringfügig höher, als die herkömmlicher MonoMac6 Zellen (13,0%). (Daten nicht abgebildet)

6.5.4.1.3 Überprüfung der Stimulierbarkeit

Um zu kontrollieren, ob die Stimulierbarkeit der Zellen durch LPS sich durch die Transfektion verändert hat, wurden alle drei Zelllinien, nicht-transfizierte MonoMac6, TF-transfizierte MonoMac6 und die G418-Zelllinie, vier Stunden mit 200ng/ml bzw. 1000ng/ml LPS stimuliert und IL-1 β , IL-8 und TNF α , wie unter 5.2.3.3 beschrieben, durchflusszytometrisch bestimmt. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse dargestellt.



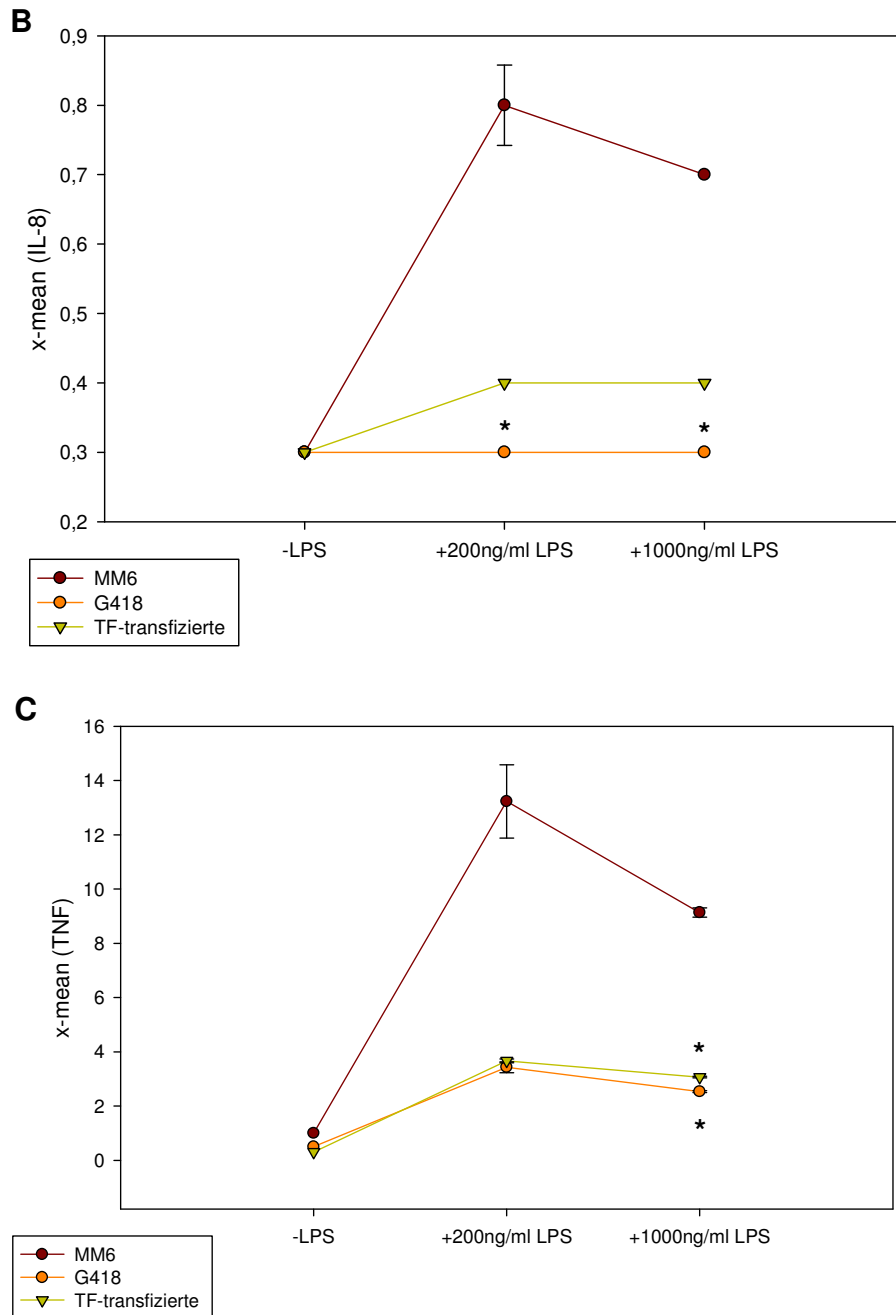


Abbildung 31: Vergleich der Zytokinproduktion von MonoMac6 Zellen, der TF-transfizierten Zelllinie und der transfizierten Kontrollzelllinie G418 ohne LPS-Stimulation bzw. nach Stimulation mit 200 oder 1000ng/ml LPS (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) (*statistisch signifikanter Unterschied zu nicht transfizierten MonoMac6 Zellen; $p < 0,05$; ANOVA, $n=3$)

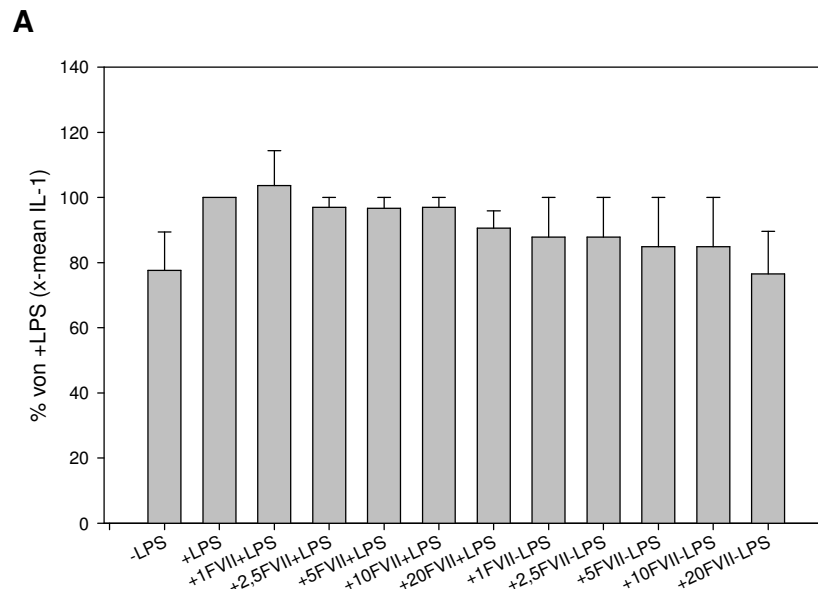
Beide transfizierten Zelllinien produzierten mindestens bei einer der beiden LPS-Konzentrationen signifikant weniger IL-1 β oder TNF α . IL-8 wurde nur von der Kontrollzelllinie statistisch signifikant reduziert synthetisiert. Die TF-transfizierte Zelllinie ergibt IL-8 Werte nur knapp über dem Nullwert, aber der Unterschied zu den nicht-

transfizierten Zellen ist statistisch nicht signifikant. Insgesamt ist zu erkennen, dass die Transfektion die Stimulierbarkeit der Zellen beeinträchtigt.

6.5.4.2 Effekt von rekombinantem, aktiviertem Faktor VII auf TF-transfizierte Zellen

6.5.4.2.1 Durchflusszytometrie

Die, wie unter 5.2.5 beschrieben, gewonnenen, mit TF transfizierten MonoMac6 Zellen, wurden analog den herkömmlichen Zellen eine Stunde mit rFVIIa (1-20µg/ml) präinkubiert und anschließend vier Stunden mit 200ng/ml LPS stimuliert oder zur Kontrolle unstimuliert gelassen. Die Zytokinproduktion wurde, wie unter 5.2.3.3 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.



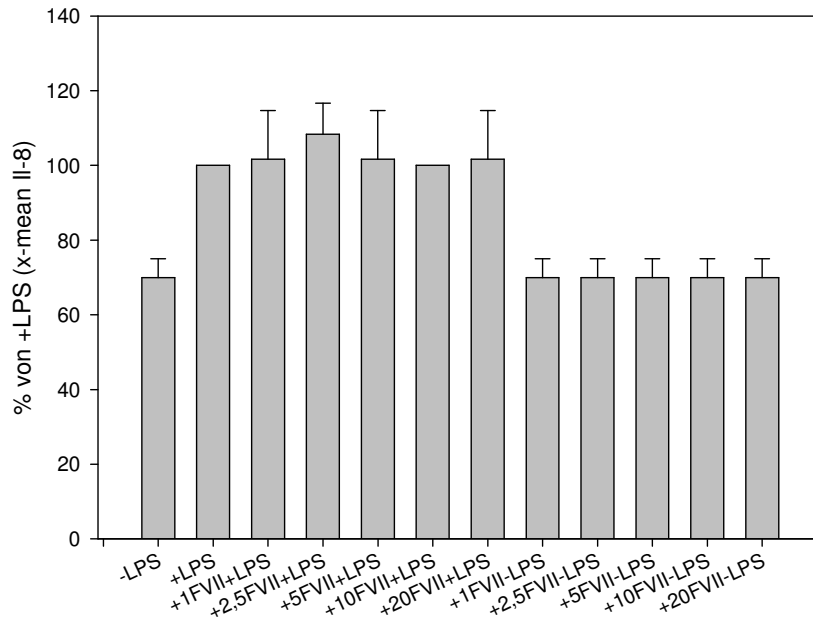
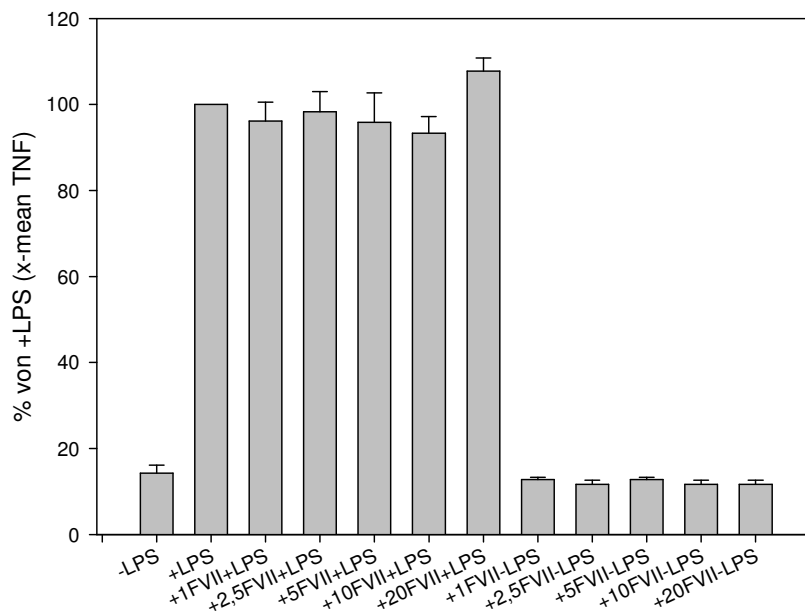
B**C**

Abbildung 32: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von TF-transfizierten MonoMac6 Zellen (+LPS=200ng/ml) (ANOVA mit +LPS als Kontrollgruppe; $p < 0,05$; $n = 3$)

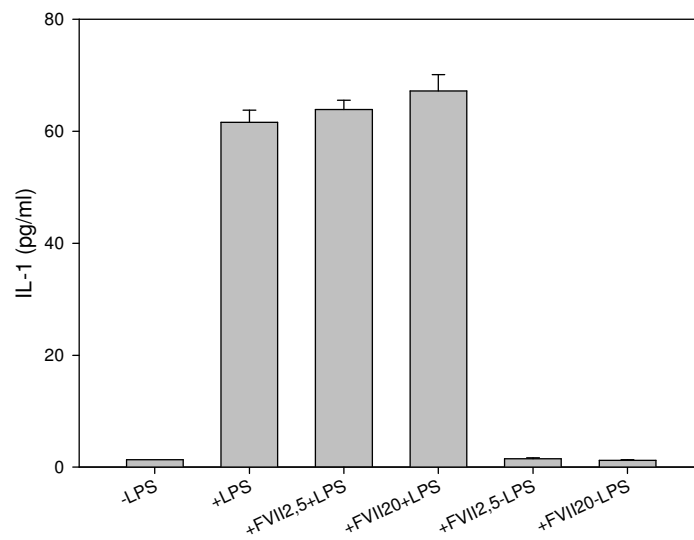
Wie unter 6.5.4.1.3 bereits beschrieben, zeigten die transfizierten Zellen eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber LPS. Deshalb erkennt man in Abbildung 32A kaum einen Unterschied in der IL-1 β -Synthese zwischen LPS-stimulierten und unstimulierten Zellen.

Keines der drei gemessenen Zytokine wurde in seiner Produktion durch die Zugabe von rFVIIa beeinflusst, weder bei LPS-stimulierten, noch bei unstimulierten Zellen.

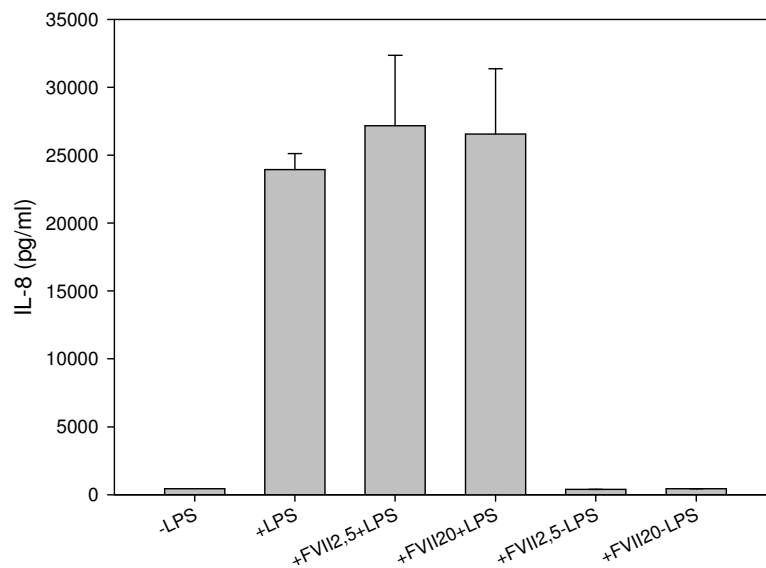
6.5.4.2.2 Bioplexmessungen

Die Ergebnisse der Zytokinbestimmungen aus dem Kulturüberstand von TF-transfizierten Zellen sind in Abbildung 33 dargestellt. Die Zellen wurden eine Stunde mit 2,5 bzw. 20µg/ml rFVIIa präinkubiert und anschließend 23 Stunden mit 200ng/ml LPS stimuliert oder zur Kontrolle unstimuliert gelassen. Die Zytokine wurden, wie unter 5.2.4.2 beschrieben, bestimmt.

A



B



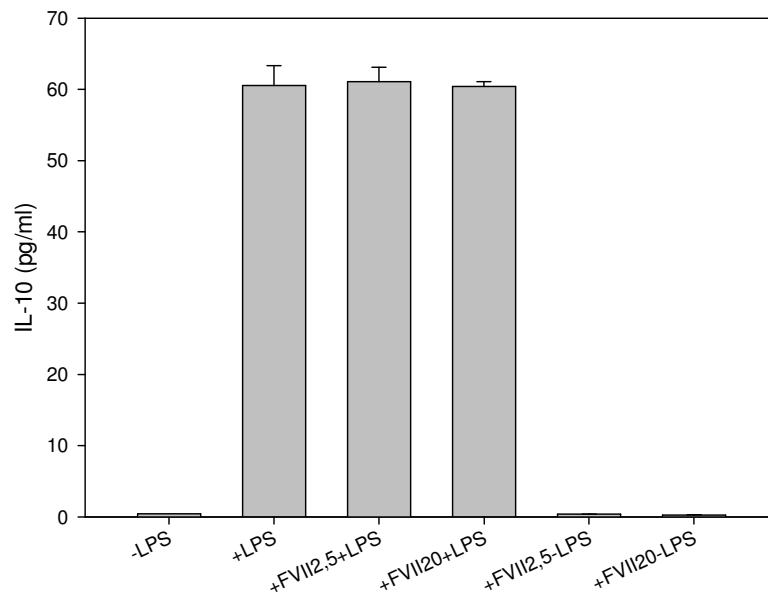
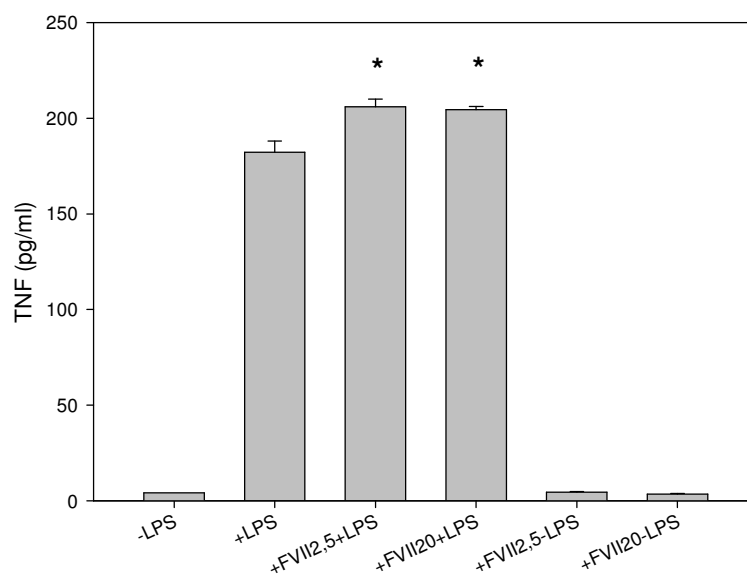
C**D**

Abbildung 33: Bioplex Bestimmung des Einflusses von rFVIIa (µg/ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1β; B: IL-8; C: IL-10; D: TNFα) von TF-transfizierten MonoMac6 Zellen (+LPS=200ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; p<0,05; ANOVA, n=3)

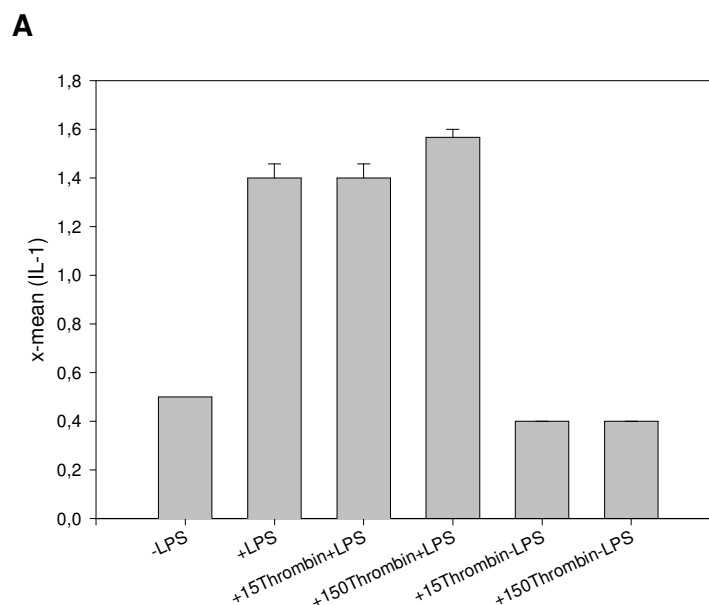
Die LPS-induzierte TNFα-Ausschüttung der transfizierten Zellen nahm unter dem Einfluss von rFVIIa in beiden eingesetzten Konzentrationen um 12% (20µg/ml) bzw. 13% (2,5µg/ml) zu. (s. Abbildung 33D) Alle anderen Zytokinkonzentrationen wurden durch die Zugabe von rFVIIa nicht beeinflusst.

6.6 Ist der beobachtete immunmodulatorische Effekt von rekombinantem, aktiviertem Faktor VII eine thrombinabhängige Wirkung?

6.6.1 Effekt von Thrombin

6.6.1.1 Durchflusszytometrie

Thrombin gilt als Induktor der Entzündungsantwort.[92] Die Bindung von rFVIIa an TF führt über die Gerinnungskaskade zur Ausschüttung großer Mengen Thrombin. Um zu untersuchen, ob rFVIIa indirekt durch die Produktion von Thrombin einen Einfluss auf die Entzündungsantwort in diesem Zellkultur-Modell hat, wurden MonoMac6 Zellen direkt mit 15 bzw. 150 I.E./ml Thrombin eine Stunde präinkubiert und anschließend mit 200 ng/ml LPS stimuliert und für weitere vier Stunden inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auch ohne LPS-Stimulus durchgeführt, da in der Literatur eine Zytokinproduktion durch die Behandlung mit Thrombin alleine beschrieben wird. [62, 63] Die produzierten Zytokine wurden, wie unter 5.2.3.3 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt.



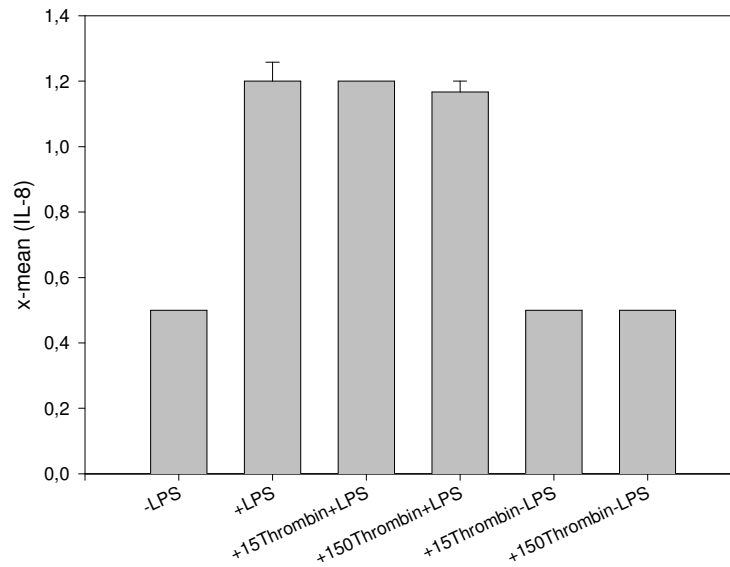
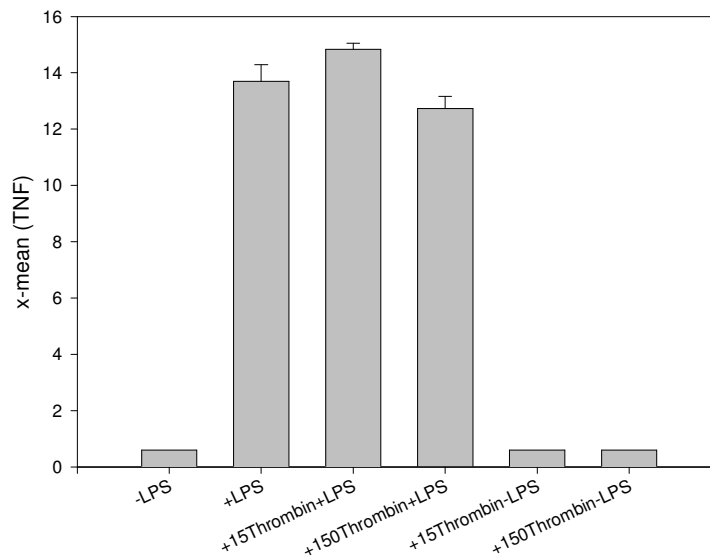
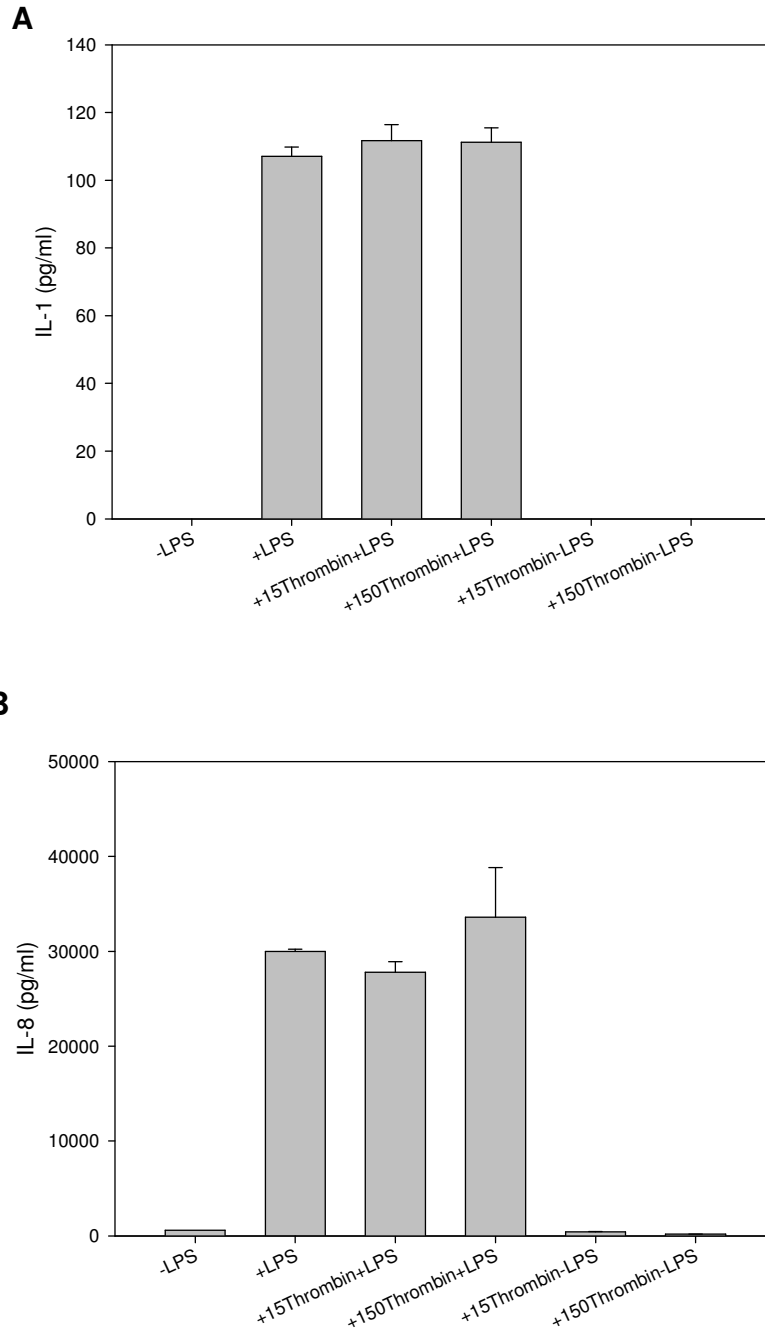
B**C**

Abbildung 34: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von Thrombin (nM) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=200ng/ml LPS) (ANOVA mit +LPS als Kontrollgruppe; $p < 0,05$; $n=3$)

Es war kein Einfluss von Thrombin auf die de-novo-Synthese der gemessenen Zytokine der LPS-induzierten Entzündungsantwort von MonoMac6 Zellen erkennbar. Auch ohne Zugabe von LPS führte Thrombin zu keiner Zytokinsynthese.

6.6.1.2 Bioplexmessungen

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der Zytokinbestimmungen aus dem Zellkulturüberstand nach Behandlung mit Thrombin dargestellt. Die Ergebnisse wurden, wie unter 5.2.4.2 beschrieben, bestimmt.



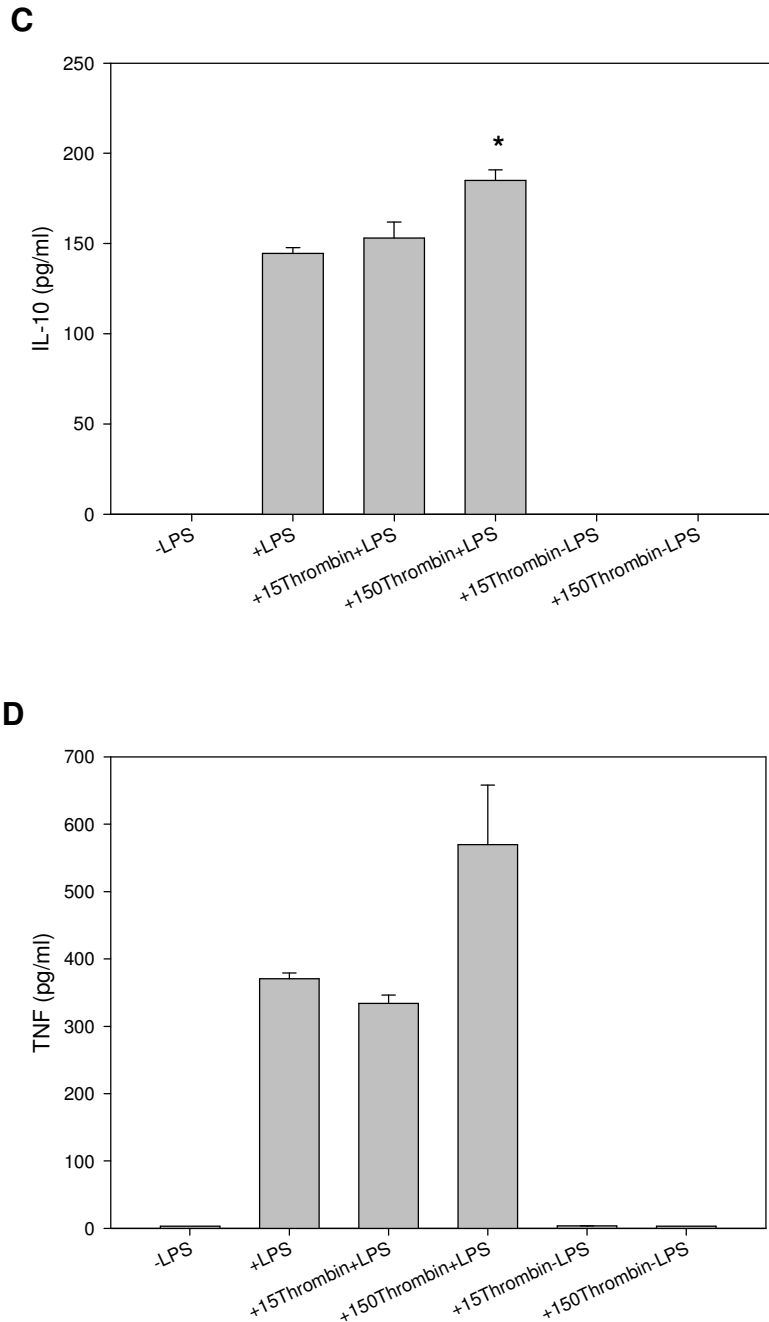


Abbildung 35: Bioplex Bestimmung des Einflusses von Thrombin (nM) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=200ng/ml LPS) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p < 0,05$; ANOVA, $n=3$)

Thrombin führte in einer Konzentration von 150 I.E. zu einer Erhöhung der LPS-induzierten IL-10-Ausschüttung um 28%. (Abbildung 35C) Alle anderen Zytokinkonzentrationen zeigten keinen signifikanten Unterschied gegenüber dem Ausgangswert durch die Zugabe von Thrombin. Die TNF α -Sekretion erscheint zwar um 199 pg/ml erhöht, das 95% Konfidenzintervall der Mittelwertdifferenz der Gruppen mit

und ohne 150 I.E. Thrombin+LPS liegt jedoch zwischen -545,4 und 147,6, was die These, dass kein Unterschied besteht, bekräftigt. Auch bei IL-8 ist das den Wert Null beinhaltende Konfidenzintervall der Grund für das Nichterreichen der geforderten Signifikanz.

6.6.2 Bestimmung der Thrombinaktivität im Medium

Zur Überprüfung, ob im Zellkultur-Medium oder in anderen Reagenzien bereits Thrombin enthalten ist, oder ob es durch die Zugabe von rFVIIa in diesem Modell zu einer Produktion von Thrombin kommt, welches möglicherweise den Versuchsablauf beeinflussen könnte, wurde die Thrombinaktivität, wie unter 5.2.8 beschrieben, bestimmt. Untersucht wurde das Zellkulturmedium mit und ohne FCS, verschiedene Reagenzien, der Zellkulturüberstand direkt vor dem Mediumswechsel und Überstände nach Inkubationen mit den Reagenzien. Die Inkubationszeiten wurden analog zu den durchflusszytometrischen Versuchen gewählt. Es wurden also 1×10^6 Zellen/ml (MonoMac6 oder TF-transfizierte MonoMac6) vier Stunden mit 200 ng/ml LPS inkubiert, evtl. eine Stunde mit 20 µg/ml rFVIIa präinkubiert oder auch vier Stunden mit 100 ng/ml TNFα vorbehandelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

		Gesamtaktivität (pM Thrombin-Äquivalente)	Hirudin-hemmbarer Aktivität (pM Thrombin)
1	MonoMac6 Medium ohne FCS	0	0
2	MonoMac6 Medium mit 10% FCS	98	57
3	100 ng/ml TNFα in RPMI	0	-1
4	20 µg/ml FVIIa in RPMI	10	1
5	200 ng/ml LPS in RPMI	0	0
6	Zellkulturüberstand MonoMac6	113	58
7	Zellkulturüberstand TF-transfizierte	116	62
8	Überstand MonoMac6+LPS	118	64
9	Überstand TF-transfizierte+LPS	114	58
10	Überstand MonoMac6+FVIIa+LPS	165	94
11	Überstand TF-transfizierte+FVIIa+LPS	171	93
12	Überstand MonoMac6+TNF	128	69
13	Überstand MonoMac6+TNF+LPS	123	59
14	Überstand MonoMac6+TNF+FVIIa+LPS	147	79

Tabelle 5: Thrombinaktivität verschiedener Reagenzien und Versuchsüberstände dargestellt als Gesamtaktivität und als Hirudin-hemmbarer, also tatsächlich durch Thrombin verursachte Aktivität (Versuche unter Zugabe von rFVIIa grau unterlegt) (Vermutlich nötige Konzentration um PAR-1 zu aktivieren: 1000 pM (Erfahrungswerte Prof. Sommerhoff)) (n=1)

Es ist, wie unter 5.2.8 erläutert, immer die Gesamtaktivität der Probe und die durch Hirudin hemmbare Aktivität angegeben, da das fluorogene Substrat nicht vollständig spezifisch für Thrombin ist. Es wurde jeweils zwischen 45 und 55% der Gesamtaktivität

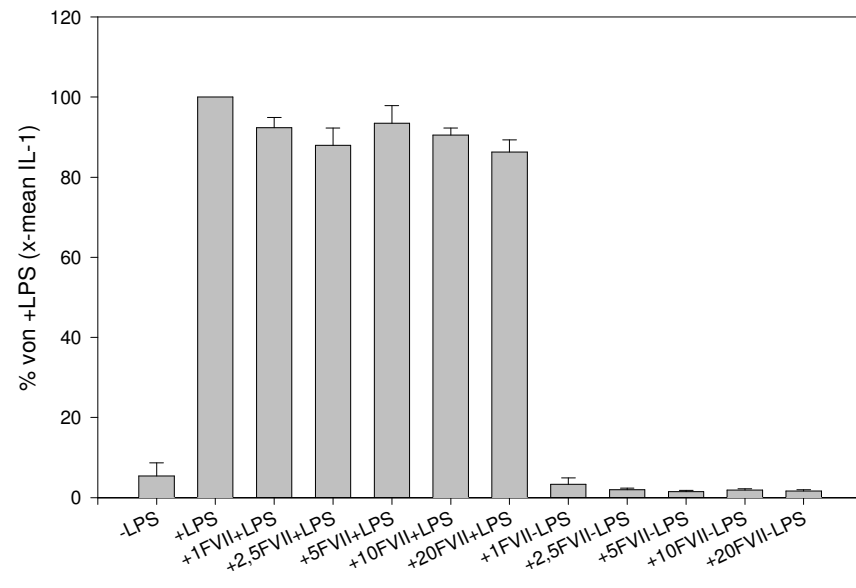
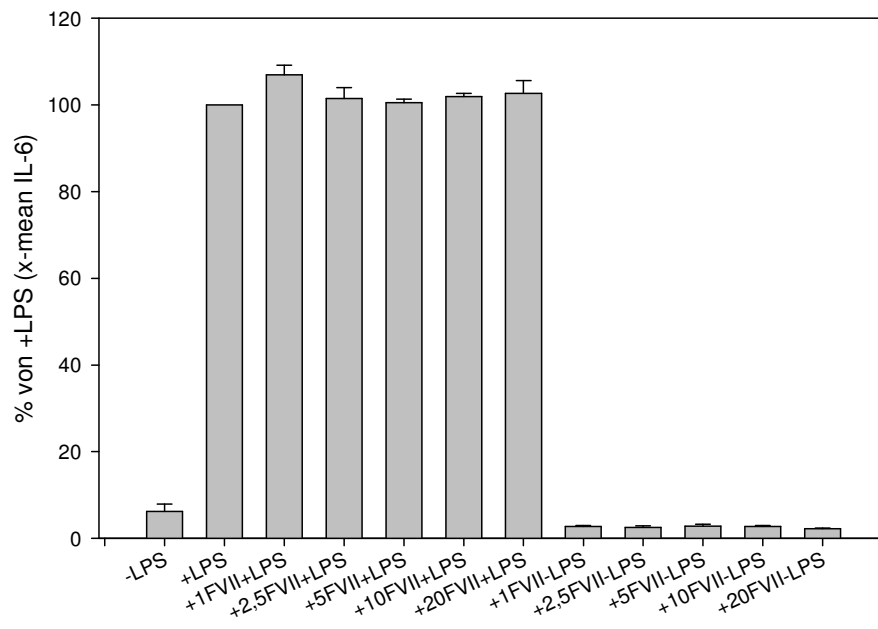
von Thrombin verursacht. Im Folgenden wird nur die durch Hirudin hemmbare Aktivität betrachtet.

Medium oder Reagenzien ohne FCS zeigten keine oder minimale Thrombinaktivität (vgl. Zeile 1, 3, 4 und 5). Medium mit FCS, Zellkulturüberstände oder Überstände von Versuchen ohne rFVIIa hatten eine Thrombinaktivität von 52-69pM. Nach Inkubation mit rFVIIa waren die gemessenen Werte durchgängig höher (79-94pM, Zeilen 10, 11 und 14). Es war dabei unerheblich, ob die verwendeten Zellen eine erhöhte TF-Oberflächenexpression nach TNF α -Vorbehandlung oder durch Transfektion hatten, oder nicht.

6.7 Effekt von rekombinantem, aktiviertem Faktor VII auf periphere humane Blutzellen und Frage nach klinischer Relevanz

6.7.1 Einfluss von rekombinantem, aktiviertem Faktor VII auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion von PBMCs

Zur Untersuchung der immunmodulatorischen Wirkung von rFVIIa auf periphere Monozyten von gesunden Probanden wurden, wie unter 5.2.6 beschrieben, PBMCs gewonnen. Unter den drei Probanden befanden sich ein männlicher und zwei weibliche Personen. Das Alter der Probanden betrug 26, 27 und 48 Jahre. Die Versuche wurden nach dem Standardverfahren, eine Stunde Präinkubation mit 1-20 μ g/ml rFVIIa und anschließende Stimulation mit 200ng/ml LPS für vier Stunden, durchgeführt. Die Zytokinproduktion wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (siehe 5.2.3.3) Dabei wurden nur die Werte für CD14+ Zellen betrachtet. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse dargestellt.

A**B**

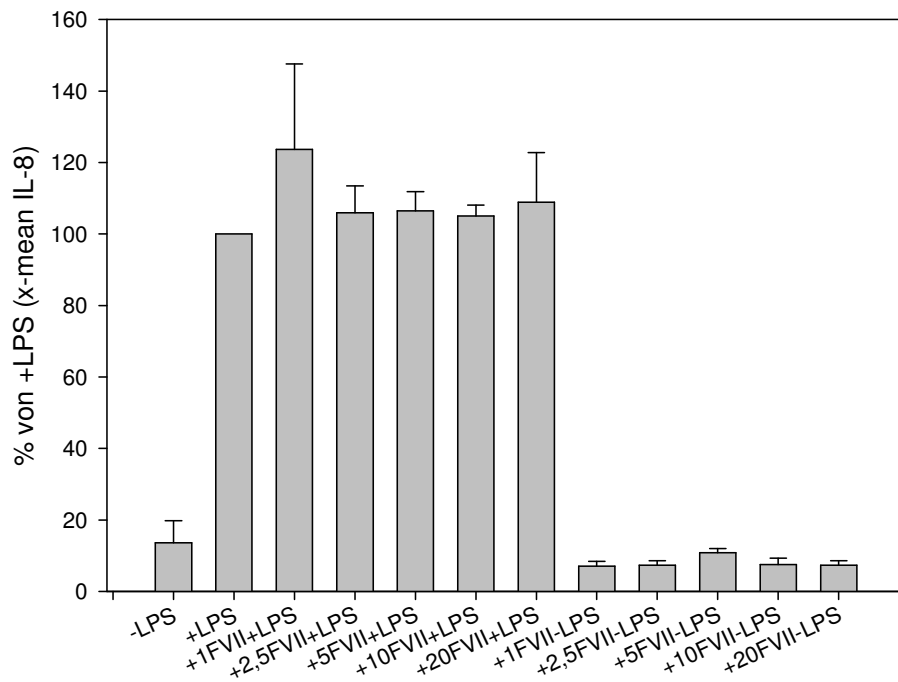
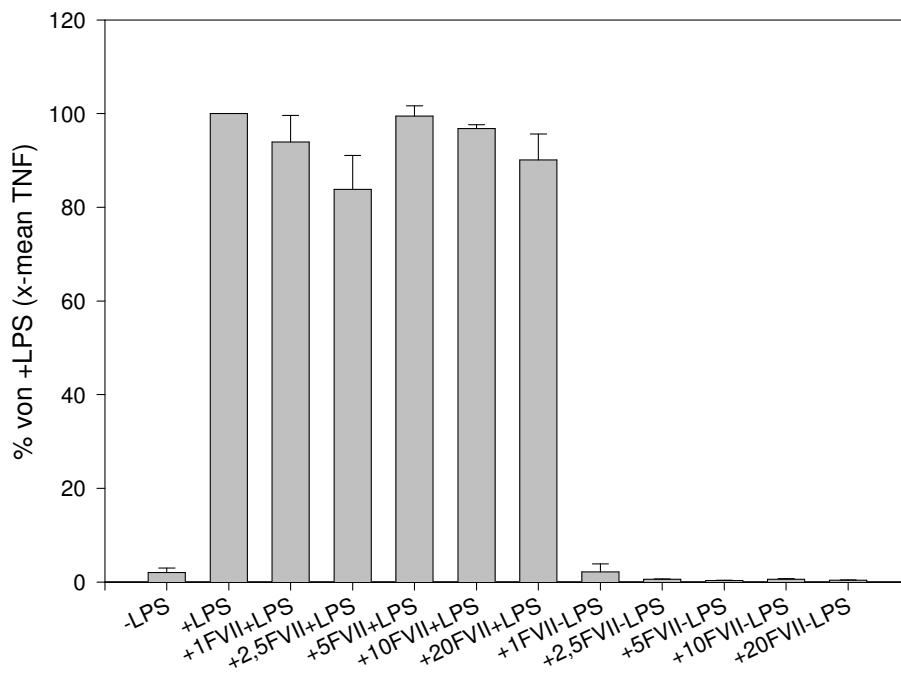
C**D**

Abbildung 36: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-6; C: IL-8; D: TNF α) von CD14 $^{+}$ PBMCs gesunder Probanden (+LPS=200ng/ml) (ANOVA mit +LPS als Kontrollgruppe; $p < 0,05$; $n=3$)

Es ergab sich keinerlei immunmodulatorischer Einfluss von rFVIIa auf die LPS-induzierte Zytokinsynthese von peripheren Monozyten.

6.7.2 Tissue factor-Aktivität von peripheren Monozyten intensivmedizinisch-behandelter Patienten

Aus dem Blut einer Gesundkontrolle und dreier intensivmedizinisch-behandelter Patienten wurden, wie unter 5.2.6 beschrieben, periphere Monozyten gewonnen. Die Patienten wurden anhand ihrer, mit dem Endotoxin Activity Assay (EAA) der Firma Spectral Diagnostics, Toronto, Kanada bestimmten, hohen Endotoxin-Aktivität ausgewählt und waren ordentliche Studienpatienten aus einer derzeit laufenden, von der Ethikkommission der Universität München genehmigten Studie zur Endotoxin-Aktivitätsbestimmung beim kritisch kranken Patienten. Für jeden Patienten lag eine unterschriebene Einverständniserklärung vor.

Der EAA-Test gibt als Messwert das Verhältnis der momentanen Endotoxin-Aktivität zur maximal möglichen an. Dabei werden drei Kategorien unterschieden: niedrig (0-0,39), mittel (0,40-0,59) und hoch (0,6-1) Für die Messung der TF-Aktivität wurde nur Blut von Patienten mit hoher Endotoxin-Aktivität verwendet. Wie unter 5.2.7 beschrieben, wurden Lysate aus den gewonnenen Monozyten hergestellt und die TF-Aktivität der Zellen gemessen. Die Patientendaten und die Ergebnisse der Aktivitätsmessung sind in Tabelle 6 aufgeführt.

	Geschlecht	Alter	Endotoxin	Behandlungsgrund	TF-Aktivität (pM)
MonoMac6					62,6487
Gesundkontrolle	w	29			60,723
Patient 1	w	71	0,98	postoperative Infektion	118,699
Patient 2	m	51	0,85	schwere Brandverletzung	64,854
Patient 3	m	66	0,77	postoperative Infektion	304,315

Tabelle 6: Patientendaten und TF-Aktivitätswerte von 25.000 isolierten Monozyten

Die Monozyten der Gesundkontrolle zeigten eine TF-Aktivität von 60,723pM. Dieser Wert ist der TF-Aktivität von unstimulierten MonoMac6 Zellen sehr ähnlich. Patient 2, der aufgrund von schweren Brandverletzungen (Verbrennungen 2. und 3. Grades auf mindestens 25% der Körperoberfläche) intensivmedizinisch behandelt wurde, hatte einen TF-Aktivitätswert im Bereich der Gesundkontrolle. Die beiden Patienten mit schweren Infektionen hingegen zeigten stark erhöhte TF-Aktivitätswerte, Patient 1 um das doppelte, Patient 3 sogar eine Erhöhung auf den fünffachen Wert.

Im Rahmen der o.g. Studie fand bei den Studien-Patienten eine durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression von TF auf Monozyten statt. Es wurden dabei keine Unterschiede zwischen Gesundkontrollen und intensivmedizinisch behandelten Patienten festgestellt. (Daten nicht abgebildet, persönliche Kommunikation mit Carolin Mögele, Sibylle Conradi und Florian Heeg).

7 Diskussion

7.1 Wahl der Messmethode

Die Wahl der Messmethode sollte vom zu betrachtenden Zytokin abhängig gemacht werden. TNF α wird sehr schnell synthetisiert und ist intrazellulär sehr gut nachweisbar. Im Zellkulturüberstand wird es schnell abgebaut und kann durch lösliche oder zelluläre Rezeptoren abgefangen werden, so dass die Absolutwerte bei Bioplexmessungen, verglichen mit denen anderer Zytokine, sehr niedrig waren. Beim durchflusszytometrischen Messverfahren hingegen, zeigten MonoMac6 Zellen immer die höchste mittlere Fluoreszenzintensität für TNF α . Für dieses frühe Zytokin scheint also die Momentaufnahme der Zytokinproduktion per Durchflusszytometrie nach einer kürzeren Inkubationszeit die geeignete Messmethode zu sein. Bei der intrazellulären Messung von IL-1 β hingegen wird nicht zwischen der aktiven Form und dem inaktiven Vorläuferprotein unterschieden. Dadurch entsteht ein relativ hoher „Nullwert“, da das inaktive Protein bereits in unstimulierten Zellen im Zytosol vorhanden ist. IL-8 und besonders IL-10 benötigen eine längere Inkubationszeit, um in ausreichender Menge produziert zu werden. Bei der intrazellulären Messung wirkt der zugegebene Sekretionsinhibitor bei zu langer Inkubationszeit toxisch, deshalb stellt hier die Überstandmessung eine geeignete Methode dar.

7.2 Aktiviertes Protein C

Sterblichkeit und Morbidität von Patienten mit Sepsis korrelieren mit niedrigen Protein C Blutkonzentrationen. Zugleich ist die Aktivierung von Protein C während der schweren Sepsis beeinträchtigt.[27] Die Substitution von APC bei Patienten mit schwerer Sepsis ergab eine verminderte 28-Tage Sterblichkeit in einer klinischen Studie der Phase 3.[26] Zum Einfluss von APC auf die Zytokinproduktion von Monozyten, der möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Krankheitsbildes der Sepsis zukommt, gibt es jedoch immer noch kontroverse Veröffentlichungen. In der vorgelegten Arbeit sollte deshalb der Einfluss von APC auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion einer Zelllinie mit den Eigenschaften reifer Monozyten untersucht werden.

Vorangegangene experimentelle Untersuchungen des Effekts von APC auf die LPS-induzierte Entzündungsantwort von humanen PBMCs in unserer Arbeitsgruppe ergaben bisher keinen Anhaltspunkt für einen Einfluss von APC auf die LPS-induzierte

Zytokinproduktion von humanen PBMCs [93]. Diese Ergebnisse waren unter serumfreien Bedingungen durch die Messung von Zytokinspiegeln im Zellkulturüberstand gewonnen worden. Angesichts der gezeigten Effektivität von APC in klinischen Studien im Bezug auf verminderte Sterblichkeit sollte untersucht werden, ob das Ausbleiben des Effekts auf die von uns im Vorfeld gewählten experimentellen Bedingungen zurückführbar sein könnte.

Die Forschungsmeinung in der Literatur ist in zwei Lager gespalten. Es liegen Berichte vor, die zum einen eine APC-abhängige Suppression der Immunantwort beschreiben, andere Autoren konnten keinen Effekt feststellen, wie etwa Czeslick et al., bei denen keine Auswirkung von APC auf die IL-6- und TNF α -Produktion von isolierten, humanen Monozyten festzustellen war.[37] Dabei wurde die Zytokinproduktion intrazellulär, mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Stephenson et al., die einen vermindernden Effekt von APC auf die TNF α -, IL-1 β -, IL-6- und IL-8-Produktion von THP-1 Zellen feststellten, verwendeten ein Luminex 100 System.[36] In der vorgelegten Arbeit wurde deshalb die Zytokinproduktion sowohl durchflusszytometrisch als auch mit einem Luminex 100 Immunassay bestimmt. Schmidt-Supprian et al. beschrieben eine Verminderung der LPS-induzierten TNF α -Sekretion von THP-1 Zellen durch APC, welche jedoch durch in der Zellkultur enthaltenes Serum inhibiert wurde. Die Konzentrationen im Zellkulturüberstand wurden dabei per ELISA bestimmt.[91] Deshalb wurde in der vorgelegten Arbeit jeweils eine Versuchsreihe mit und eine ohne Serum im Stimulationsmedium durchgeführt. Zusammenfassend muss aber für die Bewertung der Ergebnisse festgehalten werden, dass neben der Art der Messung auch die Kinetik des Experiments und die Konzentrationen von LPS und APC Einfluss auf die beobachtete Antwort der Immunzellen haben, und so einen Vergleich zwischen den einzelnen Veröffentlichungen sehr schwer machen.

In der vorgelegten Arbeit konnte analog zu Czeslick et al., unabhängig vom Serumgehalt des Mediums, kein Einfluss auf die durchflusszytometrisch bestimmte, intrazelluläre TNF α -Produktion von Monozyten festgestellt werden. Auch die IL-8-Produktion blieb unbeeinflusst. Lediglich die IL-1 β -Produktion wurde durch 100 μ g/ml APC signifikant um 17% vermindert, und dies auch nur bei Verwendung von serumhaltigem Stimulationsmedium.

Mit der Bioplexmethode hingegen konnte in serumfreiem Medium unter Einfluss von 100 μ g/ml APC eine signifikante Verminderung der IL-1 β -, IL-10- und TNF α -Konzentration im Zellkulturüberstand der MonoMac6 Zellen um 48%, 28% bzw. 46% festgestellt werden, in serumhaltigem Medium wurden die Zytokine nur um 20 bzw. 22%

(IL-1 β , IL-8 bzw. TNF α) vermindert produziert. Ähnlich wie in der Arbeit von Schmidt-Supprian et al. konnte also eine stärkere Reduktion der Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand bei Verwendung von serumfreiem Medium beobachtet werden. Die totale Unterdrückung des APC-Effekts durch Serum im Medium, wie von Schmidt-Supprian beschrieben, sahen wir aber nicht. Im Gegenteil, die Reduktion der Zytokinsynthese durch APC war immer noch für drei der vier gemessenen Größen signifikant und entspricht damit dem im serumfreien Medium beobachteten Effekt, auch wenn die Effektstärke abgemildert ist. Eine mögliche Erklärung mag hier die höhere Dosis APC liefern, die in der vorgelegten Arbeit eingesetzt wurde.

Schmidt-Supprian et al. postulierten, im Serum enthaltene Inhibitoren für APC seien ursächlich für die vollständige Aufhebung des APC-Effekts.[91] Unsere Ergebnisse bestätigen diese These nicht, da im Serum enthaltene Inhibitoren für APC dessen Effekt ungeachtet der Inkubationszeit und Methode aufheben müssten. Bei Verwendung der durchflusszytometrischen Messmethode scheint der Serumgehalt des Mediums jedoch keinen inhibierenden Einfluss zu haben, der Effekt von APC ist hier sogar nur in serumhaltigem Medium signifikant. Möglicherweise ist das ein Hinweis auf Unterschiede in den zugrundeliegenden Mechanismen. Die Reduktion der IL-1 β -Synthese nach fünfständiger Inkubationszeit in den durchflusszytometrischen Experimenten könnte auf einem Mechanismus beruhen, für den im Serum enthaltene Kofaktoren von Nöten sind. Die mit dem Bioplex-System festgestellte Reduktion der Zytokinsekretion durch APC innerhalb einer 24-stündigen Inkubationszeit könnte hingegen ein direkter Effekt von APC sein, für den kein Kofaktor notwendig ist. Die Verminderung der Reduktion der Zytokinsynthese durch APC in serumhaltigem Stimulationsmedium bei den Bioplexmessungen könnte dann z.B. mit einer Veränderung der Rezeptoren für APC durch im Serum enthaltene Substanzen erklärt werden. So wie die Anwesenheit von APC am EPCR die Reaktion der Zelle auf eine Aktivierung von PAR-1 durch Thrombin möglicherweise verändert (s.7.4) [94, 95], könnte auch das Ergebnis der Aktivierung von PAR-1 durch den APC/EPCR-Komplex durch im Serum enthaltene Proteasen beeinflusst werden.

Die mit der Bioplexmethode festgestellte Verringerung der TNF α -Produktion deckt sich mit einer Vielzahl von Veröffentlichungen [35, 36, 91, 96], als verantwortlicher Mechanismus wurde dabei die Verhinderung der Aktivierung von NF κ B beschrieben.

Die Reduktion der Ausschüttung von IL-1 β , welches durch die Stimulation von TLR-Rezeptoren als eines der frühesten Zytokine in der Entzündungsantwort bereitgestellt wird,

wurde auch von Stephenson et al. gezeigt. Sie wiesen außerdem einen Einfluss auf die IL-8-Produktion von THP-1 Zellen nach, der bei unseren Versuchen mit MonoMac6 Zellen nicht bestätigt werden konnte.[36] Die Werte für IL-10 lagen bei diesen Messungen mit THP-1 Zellen unter der Nachweisgrenze, deshalb veröffentlichte die gleiche Arbeitsgruppe 2008 eine Versuchsreihe zum Einfluss von APC auf die LPS-induzierte IL-10-Expression humaner Monozyten, die aus PBMCs gesunder Spender gewonnen wurden. Sie fanden eine erhöhte IL-10 Ausschüttung unter APC-Einfluss[97], was den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit widerspricht, dies könnte aber auf die unterschiedlichen verwendeten Zellen zurückzuführen sein.

Nach fünfstündiger Inkubationszeit (durchflusszytometrische Methode) war lediglich ein Effekt auf die Produktion von IL-1 β feststellbar, welches bereits als Vorläuferprotein im Zytosol vorliegt. Es mag sein, dass die Produktion dieses Zytokins deshalb am schnellsten auf äußere Einflüsse anspricht. Der Effekt von APC auf die restlichen Zytokine wird möglicherweise erst nach einer längeren Inkubationszeit deutlich, die nur bei Überstandsmessungen möglich ist. Bei der durchflusszytometrischen, intrazellulären Methode ist ein Sekretionsinhibitor nötig, der nach mehr als zehn bis zwölf Stunden Inkubationszeit toxisch wirkt. Die Messung der Beeinflussung der IL-6-Produktion durch gerinnungsaktive Substanzen war mit dem in dieser Arbeit verwendeten Modell nicht möglich, da MonoMac6 Zellen keine relevanten Mengen an IL-6 synthetisieren. Diese Zelllinie ist aber bislang die einzige mit den Eigenschaften reifer Monozyten.[87]

Insgesamt zeigt sich unter dem Einfluss von APC eine Reduktion der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung. Neben dem positiven Effekt der Wiederherstellung der Antikoagulation während der Sepsis trägt APC also auch zum Ausgleich des Gleichgewichts zwischen Pro- und Antiinflammation bei. Je nach Konstitution des Patienten, Virulenz des Erregers oder Schwere bzw. Ausmaß der Verletzung kann die nachfolgende Immunreaktion auf die pro- oder auf die antiinflammatorische Seite kippen. Daher könnte eine rein antiinflammatorisch wirkende Substanz, die einem Sepsispatienten im vorherrschend hypoimmunologischen Zustand verabreicht wird, auch den Allgemeinzustand verschlechtern.[11] APC vermindert in dem hier untersuchten Modell sowohl die Synthese pro- als auch die antiinflammatorisch wirkender Mediatoren, was eine Erklärung für dessen Wirksamkeit bei dem sehr heterogenen Kollektiv der Sepsispatienten sein könnte.

7.3 Antithrombin III

Auch Antithrombin wird während der Sepsis und anderen akut entzündlichen Zuständen verbraucht und/oder inaktiviert.[98] Die Substitutionstherapie erwies sich in einer klinischen Studie der Phase 3 als nicht erfolgreich.[38] In Tiermodellen und klinischen Studien der Phase 2 zeigte sich aber eine verminderte Sterblichkeits- und Organdysfunktionsrate.[39-45, 99, 100]

Die von uns durchgeführten Versuche zeigen, dass auch ATIII einen hemmenden Effekt auf die überschießende Zytokinproduktion von Monozyten hat. So wurde mit der durchflusszytometrischen Messung der intrazellulären Zytokinsynthese eine dosisabhängige Verminderung der IL-1 β - und TNF α -Bildung um bis zu 71% bzw. 55% der zellulären de-novo-Synthese dieser Zytokine unter dem Einfluss von ATIII nachgewiesen. Im Gegensatz zu APC scheint ATIII seinen Einfluss schneller zu übermitteln, da nach fünfstündiger Inkubationszeit bereits deutliche Veränderungen festzustellen waren. Nach 24-stündiger Inkubationszeit konnte mit der Bioplexmethode lediglich noch die Verminderung der IL-1 β -Ausschüttung um maximal 71% bestätigt werden, auch hier deutlich dosisabhängig.

Die Verminderung der LPS-induzierten TNF α -Produktion deckt sich mit den Ergebnissen von Oelschläger et al., die eine dosisabhängige Reduktion der Expression und Proteinproduktion NF κ B-kontrollierter Gene feststellten.[52] Die Beeinflussung der IL-1 β -Synthese durch ATIII konnten Totzke et al. in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur nachweisen.[53]

Für IL-8 und IL-10 war keine signifikante Veränderung der Zytokinexpression der MonoMac6 Zellen durch ATIII nachweisbar. In Reviews von Roemisch et al. und Opal et al. werden zwar Abstracts zitiert, die eine Verminderung der LPS-induzierten IL-8-Produktion postulieren, es gibt jedoch darüber hinaus noch keine Veröffentlichungen mit experimentellen Daten, die diese Aussagen unterstützen.[101, 102] Im Tiermodell zeigten Minnema et al. nach einer letalen *E.coli*-Dosis mit gleichzeitiger ATIII-Gabe eine Erhöhung der IL-8-, und eine Reduktion der IL-10-Konzentration im Blut im Vergleich zur Kontrollgruppe [42], bei Patienten mit schwerer Sepsis hingegen konnten Inthorn et al. keinen Einfluss von ATIII auf den Plasmaspiegel von IL-8 feststellen.[45] ATIII reduziert nach unseren Ergebnissen lediglich die Synthese der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β , nicht aber die von IL-10. Geht man davon aus, dass APC deshalb wirksam ist, weil es sowohl eine überschießende Pro- als auch Antiinflammation dämpfen kann, könnte

die nicht vorhandene Wirkung auf die Antiinflammation eine Erklärung für das Fehlen des klinischen Wirksamkeitsnachweises für ATIII bei Patienten mit schwerer Sepsis sein.

Heparin spielte bei der Interpretation der klinischen Studienergebnisse aus dem KyberSept-Trial und der anschließenden Metaanalysen eine besondere Rolle. Denn man postulierte eine negative Beeinflussung des ATIII-Effekts durch die gleichzeitige Gabe von Heparin.[38, 46, 103] Die inhibierende Wirkung von ATIII auf die Aktivierung von NF κ B ist vermutlich von einer intakten Heparinbindungsstelle des Proteins abhängig.[52] Diese Annahme deckt sich mit der gängigen Meinung, dass der antiinflammatorische Effekt von ATIII über die Bindung an heparinähnliche GAGs an der Zelloberfläche vermittelt wird.[47, 69, 104] Es wurde nachgewiesen, dass Heparin in Ratten die Bindung von ATIII an Endothelzellen verschlechtert [105], ohne dass dies gleichzeitig zu einer Aufhebung der ATIII vermittelten Erhöhung der LPS-induzierten Prostacyclinfreisetzung führte.[106] Im Gegensatz dazu zeigten Horie et al., dass Heparin den ATIII-induzierten Prostacyclin-Anstieg in HUVECs verhindern kann.[107] Hoffman et al. beobachteten eine verminderte LPS-induzierte Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten und eine Blockierung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten durch ATIII. Beide Effekte wurden durch Heparin aufgehoben.[108] Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist uns keine Veröffentlichung bekannt, die sich mit dem Einfluss von Heparin auf den ATIII-Effekt auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion beschäftigt. In der vorgelegten Arbeit konnte keine Veränderung des ATIII-Effekts durch die Zugabe von Heparin festgestellt werden, die immunologische Wirkung von ATIII auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung von Monozyten wurde also durch Heparin nicht antagonisiert. Eine Erklärung hierfür wäre eine geringe Bindungsstabilität zwischen Heparin und ATIII, sodass zwar die momentane Wechselwirkung zwischen ATIII und der Zelle geschwächt ist, aber dies über einen längeren Zeitraum nicht zum Tragen kommt. Auch Pulletz et al. konnten zwar eine Verschlechterung der Bindung von ATIII an Endothelzellen durch Heparin feststellen, was aber die durch ATIII induzierte Prostacyclinfreisetzung der Zellen nicht veränderte.[106] Treffen Heparin und ATIII aufeinander, so gehen sie zuerst einen Erkennungskomplex mit einer niedrigen Bindungsaffinität ein, was eine Konformationsänderung von Antithrombin zur Folge hat und zur Bildung eines hochaffinen Komplexes führt.[109] Möglicherweise ist die Affinität von ATIII zu GAGs an der Zelloberfläche wie z.B. Syndecan-4 als möglichen ATIII Rezeptor stärker als zu Heparin, oder ATIII wird aus der Bindung mit Heparin nach Änderung der Konformation wieder freigesetzt und kann neue Bindungen, z.B. mit GAGs, eingehen.

Der Effekt von Heparin auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung von Monozyten zeigte sich bei der durchflusszytometrischen Messmethode mit insgesamt fünfstündiger Inkubationszeit nur in einer Verminderung der IL-1 β -Synthese um 15% in der höchsten eingesetzten Konzentration (200I.E./ml). Während mit der Bioplexmethode nach insgesamt 24 Stunden Inkubationszeit ein anderer und stärkerer Einfluss erkennbar war. Es zeigte sich eine Erhöhung der TNF α -Ausschüttung um 160% durch 200I.E./ml Heparin. Die IL-10-Konzentration im Überstand sank hingegen auf 11% (200I.E./ml) des Ausgangswertes. Alle anderen Werte blieben unverändert.

Zum immunmodulatorischen Effekt von Heparin auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung von Monozyten, welcher im Laufe dieser Untersuchungen als Kontrolle überprüft wurde, gibt es widersprüchliche Veröffentlichungen. Die hier mit der Bioplexmethode gemessene Erhöhung der TNF α - und Reduktion der IL-10-Produktion durch Heparin deckt sich mit den Ergebnissen von Heinzelmann et al.[110] Der selbe Autor veröffentlichte 2005 eine Studie, in der im Vollblutansatz eine Erhöhung der monozytären LPS-induzierten IL-8-Synthese durch Heparin beschrieben wird, was in der vorgelegten Arbeit nicht bestätigt werden konnte.[111] Hochart et al. hingegen stellten 2006 eine Reduzierung der proinflammatorischen Zytokinlevel durch Heparin bei LPS-stimulierten Monozyten fest.[112] Im Jahr 2008 jedoch veröffentlichten sie umfassendere Ergebnisse und beobachteten eine dosisabhängige paradoxe Wirkung von Heparin auf die LPS-induzierte Zytokinantwort von Monozyten. Niedrige Heparindosen (<1I.E.) wirkten inhibierend, hohe Dosen (>10I.E.) stimulierend auf die Zytokinproduktion. Außerdem beschrieben sie eine Abhängigkeit des Heparineffekts vom verwendeten Zellmodell. Bei serumfreien Monozytenkulturen hatte Heparin einen reduzierenden, in Vollblutansätzen einen stimulierenden Effekt auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion.[113] Anastase-Ravion et al. hingegen beobachteten einen deutlich inhibierenden Effekt auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung von isolierten Monozyten in serumhaltigem Medium.[114] Trotzdem ist es verwunderlich, dass bei unseren Untersuchungen bei gleichem Versuchsaufbau, je nach Messmethode, unterschiedliche immunmodulatorische Effekte feststellbar waren. Es mag zusätzlich eine zeitabhängige paradoxe Wirkung existieren, aber Hochart et al. führten alle Messungen nach sechsstündiger Inkubationszeit durch und verzeichneten bei den dieser Arbeit entsprechenden Bedingungen (hohe Dosis, serumhaltig) eine vorwiegend proinflammatorische Wirkung. Bei unseren Studien wurde hingegen nach kurzer Inkubationszeit ein schwach inhibierender Effekt gemessen. Die

immunmodulatorische Wirkung von Heparin, welche keine vorrangige Fragestellung dieser Arbeit war, lässt also noch viel Platz für weitere Untersuchungen.

7.4 Aktivierter Faktor VII

Dem Komplex aus FVIIa und TF wird als Verknüpfungspunkt zwischen Inflammation und Gerinnung große Bedeutung zugeschrieben. Die exogene Gerinnung, die durch die Bildung dieses Komplexes ausgelöst wird, wird als induzierbare Koagulation bei pathologischen Zuständen gesehen.[7] Wird rFVIIa als „rescue therapy“ bei hämorrhagischem Schock nach schwerem Trauma eingesetzt, ist gleichzeitig das Immunsystem des Patienten traumabedingt in aktiviertem Zustand, weshalb die Frage, ob rFVIIa auch die Immunreaktion beeinflusst, höchst interessant ist.

Der in dieser Arbeit durchgeführte Standardversuch (6.4.2), bei dem MonoMac6 Zellen mit rFVIIa präinkubiert und anschließend mit LPS stimuliert wurden, sollte die Auswirkungen von rFVIIa auf die Funktion der Immunzellen klären. Dabei ergab sich mit der durchflusszytometrischen Methode bei den höchsten eingesetzten rFVIIa-Konzentrationen für TNF α (10 und 20 μ g/ml rFVIIa) und IL-8 (20 μ g/ml rFVIIa) und mit der Bioplexmethode bei 2,5 und 20 μ g/ml für TNF α ein inhibierender Effekt von rFVIIa auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion von MonoMac6 Zellen. Diese Ergebnisse wären zwar eine mögliche Erklärung für die verminderten Raten an ARDS und MODS nach Gabe von rFVIIa zur Blutungskontrolle nach stumpfem Trauma[56], widersprechen aber mehreren Veröffentlichungen, die einen proinflammatorischen Effekt von FVIIa beschreiben.[9, 65, 66] Eine Erhöhung der rFVIIa Dosis bei der durchflusszytometrischen Untersuchung, um eine mögliche Verstärkung des Effekts zu erreichen, ergab keine weiteren signifikanten, modulatorischen Effekte von rFVIIa. (Daten nicht abgebildet)

Als Rezeptor für FVIIa an der Zelloberfläche ist nach gegenwärtiger Meinung TF von Bedeutung, dieser wird jedoch erst nach Aktivierung in größerer Menge auf Monozyten exprimiert. Konsequenterweise stellte sich die Frage, ob eine Erhöhung der TF-Expression eine Verstärkung des im Standardversuch beobachteten Effekts mit sich bringen würde, oder Erklärungen für die der Literatur widersprechenden Ergebnisse liefern könnte. Nach Untersuchung der Kinetik der TF-Expression an der Zelloberfläche von MonoMac6 Zellen wurden deshalb alternative Versuchsaufbauten entwickelt, um den Einfluss der Rezeptordichte auf die modulatorische Wirkung von rFVIIa zu betrachten.

Nach einer Stunde Inkubation mit LPS war noch keine Veränderung der TF-Expression zu erkennen, nach zwei Stunden stieg die Zahl der TF+ Zellen jedoch von ursprünglich knapp

20% auf 50% an. Präinkubiert man also eine Stunde mit rFVIIa, und gibt anschließend LPS zu, so dauert es drei Stunden bis eine Erhöhung der Rezeptorexpression auftritt. Deshalb wurde in einer ersten Versuchsreihe stattdessen zuerst LPS zugegeben und eine Stunde darauf rFVIIa. In diesem Fall tritt die erhöhte TF-Expression bereits eine Stunde nach Zugabe von rFVIIa auf. Nur die TNF α -Produktion beginnt bereits in den ersten beiden Stunden der LPS-Inkubation, alle anderen Zytokine werden verzögert produziert. (s 6.1.3). Bei der durchflusszytometrischen Messmethode kann diese frühe Phase, die in diesem Fall nicht unter dem Einfluss von rFVIIa steht und deshalb nicht betrachtet werden soll, durch die Zugabe des Sekretionsinhibitors erst zusammen mit rFVIIa aus der Messung ausgeschlossen werden. Bei Überstandsmessungen wird immer die gesamte Zytokinausschüttung bestimmt, weshalb dieser Versuchsaufbau nicht für die Bioplexmessungen übernommen wurde.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden MonoMac6 Zellen mit TNF α vorbehandelt. Dadurch wird zwar keine so hohe TF-Oberflächenkonzentration erreicht wie durch LPS-Präinkubation, aber gut 40% der Zellen exprimieren bereits vor Beginn des eigentlichen Versuchs TF, ohne schon eine starke Zytokinsynthese zu beginnen. Das zur Vorbehandlung der Zellen verwendete TNF α wurde vollständig abgewaschen, bevor der eigentliche Versuch und die Messung des von den Zellen produzierten TNF α begannen.

In diesen beiden Versuchsabläufen mit MonoMac6 Zellen mit erhöhter TF-Oberflächenexpression konnte kein immunmodulatorischer Effekt von rFVIIa auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion festgestellt werden.

Zur besseren Vergleichbarkeit mit bisherigen Veröffentlichungen wurde eine dritte Versuchsreihe mit LPS-vorbehandelten Monozyten durchgeführt. Muth et al., die eine Erhöhung der IL-6- und IL-8-Produktion von Makrophagen durch FVIIa beschrieben, arbeiteten mit humanen Monozyten, die mit LPS stimuliert worden waren und anschließend, nach mehrmaligem Waschen, mit rFVIIa behandelt wurden. Sie stellten dabei eine Erhöhung der IL-6- und IL-8-Ausschüttung um den Faktor 1,5 unter Einfluss von FVIIa fest.[65] Die beiden gemessenen Zytokine wurden dabei aufgrund des LPS-Stimulus sezerniert, ihre Produktion begann also schon vor Zugabe von FVIIa. Erstaunlich ist somit, dass FVIIa diesen bereits ablaufenden Vorgang noch derart beeinflussen konnte. In einem auf MonoMac6 Zellen abgestimmten, vergleichbaren Versuchsablauf wurde in der vorgelegten Arbeit der Ansatz von Muth wiederholt. Die Zellen wurden zuerst mit LPS stimuliert, bis TF an der Oberfläche erschien, anschließend gewaschen und mit rFVIIa behandelt. Die Zytokinproduktion wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei konnte

ein stimulierender Effekt auf die TNF α -Synthese der vorbehandelten Zellen festgestellt werden, jedoch nicht auf die Produktion von IL-1 β oder IL-8.

Ein vierter Versuchsablauf beinhaltete eine erste Inkubation mit LPS zur Induktion von TF. Einen Tag später wurden diese derart vorstimulierten Zellen erneut mit LPS behandelt, wobei nun Brefeldin als Sekretionsinhibitor zugegeben wurde, um die Zytokinproduktion durchflusszytometrisch erfassen zu können. Diese Versuchsreihe führte zu keinem auswertbaren Ergebnis. (Daten nicht abgebildet) Zwar blieb TF über den gesamten Zeitraum in großer Menge an der Zelloberfläche exprimiert, aber die zweite LPS-Stimulation löste keine messbare Zytokinsynthese aus, da MonoMac6 Zellen eine LPS-Toleranz entwickeln können. Dieses Phänomen wurde von Ziegler-Heitbrock et al. bereits 1992 beschrieben.[88] Vor dem Hintergrund dieser veränderten Funktion von Immunzellen nach inflammatorischem Stimulus müssen die Ergebnisse der Experimente in denen LPS zur TF-Induktion benutzt wurde mit großer Vorsicht interpretiert werden, denn es ist davon auszugehen, dass die Zellfunktion nicht mehr der von nativen MonoMac6 Zellen entspricht. Um dieses Problem experimentell zu umgehen, wurde versucht durch Transfektion eine MonoMac6 Mutante zu erzeugen, die TF konstitutionell exprimiert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Transfektion und der Funktionalität der Transfektanten wurden mehrere Kontrollversuche durchgeführt. Die TF-transfizierte Zelllinie zeigte im Western-Blot eine deutlich höhere TF-Menge als nicht transfizierte MonoMac6 Zellen, jedoch keine so hohe Proteinmenge wie LPS-stimulierte Zellen. FACS-Messungen zur Bestimmung der Oberflächenexpression ergaben hingegen nur geringfügig mehr TF+ Zellen in der transfizierten Population gegenüber der nicht transfizierten. Deshalb wurde zusätzlich die TF-Aktivität der verschiedenen Zelllinien überprüft. Auch diese war bei transfizierten Zellen nicht signifikant höher als bei herkömmlichen MonoMac6 Zellen. Außerdem zeigten sowohl die transfizierte Kontrollzelllinie als auch die TF-transfizierte Zelllinie eine Beeinträchtigung in der LPS-stimulierten Zytokinproduktion. Letzteres mag an einer Toleranzentwicklung gegen LPS durch Verunreinigungen in den zur Transfektion verwendeten Reagenzien gelegen haben. Der Western-Blot und die Entwicklung der Antibiotikumsresistenz der transfizierten Zellen deuten auf eine erfolgreiche Transfektion hin, jedoch ist das Protein weder an der Zelloberfläche detektierbar noch zeigt es Aktivität. Es ist bekannt, dass TF zu einem großen Teil intrazellulär gespeichert werden kann. Diese intrazellulären TF-Pools zeigen meist kaum funktionelle Aktivität.[115]

Die mit den TF-transfizierten Zellen durchgeführten Versuche zur Untersuchung der Modulation der LPS-induzierten Zytokinproduktion durch rFVIIa ließen einen

stimulierenden Effekt auf die Produktion von TNF α erkennen. Dieser konnte nur mit der Bioplexmethode gezeigt werden und war nicht dosisabhängig. Dieses Ergebnis muss jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, da die Reaktionsfähigkeit der Zellen nicht mehr dem Wildtyp entspricht.

Es gibt bis jetzt nicht viele Veröffentlichungen zur immunmodulatorischen Wirkung von FVIIa auf Zellen, die TF induzierbar exprimieren. Einige Versuche wurden mit konstitutiv TF-exprimierenden Zellen durchgeführt, mit Keratinozyten oder einer Brustkrebszelllinie (MDA-MB-231), dabei wurde jeweils die Freisetzung von IL-8 beschrieben.[116, 117] Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand dabei jedoch die Wirkung von FVIIa auf die Zelle, die Modulation der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung blieb außer Acht. Muth et al. arbeiteten mit LPS-vorbehandelten humanen Monozyten[65], nur Cunningham et al. untersuchten die Wirkung von FVIIa auf die LPS-induzierte Aktivierung von Monozyten.[66] Sie konnten eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies beobachten. Außerdem beschrieben sie eine verstärkte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern durch FVIIa, wobei dies nur bei TF-exprimierenden Zellen (transfiziert oder LPS-stimuliert) stattfand. Diese Veröffentlichungen deuten alle auf eine proinflammatorische Wirkung von rFVIIa hin, was in der vorgelegten Arbeit nicht eindeutig bestätigt werden konnte.

Durch die Komplexbildung von FVIIa und TF wird die exogene Gerinnungskaskade ausgelöst, die zur Entstehung großer Mengen Thrombin führt. Auf die proinflammatorische Wirkung einer Aktivierung der exogenen Gerinnung, gibt es viele Hinweise.[6-9, 118, 119] Als Verknüpfungspunkt scheint die Gruppe der PAR-Rezeptoren eine große Rolle zu spielen. Das sind G-Protein gekoppelte Transmembranproteine, die unter anderem auf Endothelzellen und mononukleären Blutzellen vorkommen. Sie werden durch Proteolyse aktiviert, hierbei entsteht ein N-Terminus, der als intramolekularer Ligand für den selben Rezeptor dient.[120] Thrombin aktiviert in erster Linie PAR-1, kann aber in höheren Konzentrationen auch PAR-3 und PAR-4 spalten. Der FVIIa/TF-Komplex sowie FXa signalisieren wahrscheinlich über PAR-2.[4] Zum Teil wird auch die Meinung vertreten, dass der FVIIa/TF-Komplex seine Signale über ein noch unbekanntes, PAR-2 ähnliches Molekül weitergibt.[7, 67] Einige Veröffentlichungen postulieren eine Aktivierung von PAR-1 durch einen Komplex aus TF, FVIIa und FXa.[121] Aktiviert man PARs auf Endothelzellen mit spezifischen Agonisten, so werden diese Zellen aktiviert, Blutplättchen und Leukozyten werden rekrutiert und IL-6 und IL-8 produziert.[120] Erstaunlicherweise wird allerdings auch der antiinflammatorische und zytoprotektive

Effekt von APC über PAR-1 vermittelt. Dabei aktiviert ein Komplex aus APC und EPCR den Rezeptor. Wie allerdings einerseits proinflammatorische Wirkungen aufgrund einer Gerinnungsaktivierung, und antiinflammatorische Effekte von APC andererseits über den selben Rezeptor vermittelt werden können, ist noch unklar.[122] In den letzten Jahren wurde jedoch festgestellt, dass die Anwesenheit von APC an seinem Rezeptor EPCR auch die Reaktion der Zelle auf eine Aktivierung von PAR-1 durch Thrombin verändert.[94, 95] Versuche mit spezifischen, antagonisierenden Antikörpern zur Klärung der Rolle von PAR-2 im Hinblick auf die von uns beobachteten Ereignisse wurden nicht durchgeführt, hätten aber Hinweise über den dem Effekt zugrunde liegenden Mechanismus liefern können.

Teil unserer Hypothese war, dass rekombinanter FVIIa auch über die Generierung von Thrombin einen indirekten immunmodulatorischen Effekt haben könnte. Um sicher zu gehen, dass nicht bereits im Medium Thrombin enthalten ist oder durch die Zugabe von rFVIIa entsteht, wurde die Thrombinaktivität in diesem Modell gemessen. Die ermittelten Werte lagen durchgehend unter 100pM. Zur Aktivierung von PAR-1 ist in vielen Zellkultur-Modellsystemen erfahrungsgemäß eine etwa um den Faktor 10 höhere Aktivität nötig (persönliche Kommunikation mit Prof. Sommerhoff). Darüber hinaus zeigen die Messungen, dass durch die Zugabe von rFVIIa in diesem Modell keine relevante Menge an Thrombin generiert wird und dieses somit auch keine Modulation herbeiführen kann.

Um zu untersuchen, ob Thrombin einen indirekten immunmodulatorischen Effekt von rFVIIa vermittelt, wurden MonoMac6 Zellen direkt damit behandelt. In den Experimenten der vorgelegten Arbeit konnte durch die Inkubation von MonoMac6 Zellen mit Thrombin alleine kein Effekt auf die Zytokinproduktion beobachtet werden. Dem gegenüber finden sich in der Literatur jedoch Beschreibungen von Naldini et al., die eine Thrombin-ausgelöste IL-10-Ausschüttung in humanen peripheren Leukozyten beobachteten.[63] Die gleiche Arbeitsgruppe stellte auch eine Thrombin-induzierte Produktion von IL-6-, IL-1 β - und TNF α in humanen Monozyten fest.[64] Hoffmann et al. hingegen beschrieben einen verstärkenden Einfluss von Thrombin auf die LPS-induzierte IL-1 β - und TNF α -Ausschüttung von humanen Monozyten, erkannten aber keine Zytokinausschüttung durch Thrombin alleine.[61] Johnson et al. untersuchten die Wirkung einer ex-vivo Gerinnungsaktivierung oder von reinem Thrombin auf Vollblut, humane Monozyten und Endothelzellen. Sie beobachteten die Ausschüttung von IL-6 und IL-8.[123] Eine Thrombin stimulierte IL-8-Freisetzung konnte auch mit kultivierten U937 Zellen nachgewiesen werden.[124] Insgesamt wird Thrombin als ein Verstärker der zellulären

Immunantwort betrachtet, unter anderem auch wegen seiner stimulierenden Wirkung auf Leukozytenadhäsion und -aktivierung.[92] Dieser stimulierende Effekt von Thrombin auf die Proinflammation konnte in der vorgelegten Arbeit nicht bestätigt werden. Es zeigte sich lediglich ein stimulierender Effekt auf die LPS-induzierte IL-10-Freisetzung. Die widersprüchlichen Ergebnisse in unserem Ansatz und der Literatur lassen sich u.U. auf Zelltyp und Dosiseffekte zurückführen. Im Jahr 2009 konnte für Thrombin außerdem ein konzentrationsabhängiger, dualer Effekt festgestellt werden. Geringe Thrombinkonzentrationen wirkten protektiv auf die endotheliale Barrierefunktion und inhibierend auf die Leukozytenadhäsion an das Endothel, während höhere Konzentrationen die Barrierefunktion des Endothels verschlechterten.[125, 126] Da für das dabei verwendete Thrombin keine Aktivität in I.E. pro mg angegeben ist, lassen sich die verwendeten Konzentrationsstufen nicht mit denen der vorgelegten Arbeit vergleichen. Aber es wird deutlich, dass auch Thrombinkonzentrationen unter 100pM PAR-1 aktivieren können, zumindest in Endothelzellen. Andererseits konnte durch direkte Zugabe von Thrombin der Effekt des Standardversuchs (6.4.2) nicht reproduziert werden, was Thrombin als Ursache für die Reduktion von IL-8 und TNF α ausschließt. Die Zugabe von Hirudin, als spezifischen Hemmstoff von Thrombin zum Zellkulturmedium, wie von Prof. Sommerhoff vorgeschlagen, würde in zukünftigen Versuchen die Möglichkeit der Störung durch Thrombin vollständig ausschließen.

Fasst man die Ergebnisse aller in der vorgelegten Arbeit verwendeten Versuchsabläufe für rFVIIa zusammen, kann daraus zwar auf einen vorhandenen, aber mit dem in der vorgelegten Arbeit verwendeten Modell nicht eindeutig charakterisierbaren, immunmodulatorischen Effekt von rFVIIa auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion von Monozyten geschlossen werden. In Zellen, die vor Versuchsbeginn kaum TF exprimierten, hatte rFVIIa in den höchsten verwendeten Konzentration einen leicht inhibierenden Effekt auf die TNF α - und IL-8-Produktion, welcher aber durch eine weitere Erhöhung der Konzentration nicht verstärkt werden konnte. In LPS-vorbehandelten Zellen konnte hingegen ein leicht stimulierender Effekt auf die TNF α -Synthese von MonoMac6 Zellen festgestellt werden. In bereits vor Versuchsbeginn TF-exprimierenden MonoMac6 Zellen wurde lediglich bei transfizierten Zellen eine erhöhte TNF α -Ausschüttung beobachtet. Diese Zellen waren aber durch die Transfektion nachgewiesenermaßen in ihrer Antwort auf LPS beeinträchtigt. Als Reaktion auf Thrombin, welches durch die Gabe von rFVIIa im physiologischen System des Vollblutes in großen Mengen entsteht, produzierten LPS-stimulierte MonoMac6 Zellen in dem hier bemühten Modell vor allem mehr IL-10, ein

antiinflammatorisches Zytokin. rFVIIa alleine, ohne Zugabe von LPS, führte in keinem der verwendeten Versuchsmodelle zu einer Zytokinausschüttung durch Monozyten, auch nicht bei vorbehandelten und dadurch TF-exprimierenden Zellen.

Der Versuchsaufbau, der die besten Voraussetzungen für eine Aussage über die immunmodulatorische Wirkung von rFVIIa bietet, ist jener, der die Verwendung von transfizierten oder TNF α -vorbehandelten Monozyten beinhaltet. In der vorgelegten Arbeit ist die Transfektion allerdings nicht vollständig gelungen, da die entstandenen Zellen nicht voll funktionell waren. Möglicherweise könnten transfizierte U937 Zellen, wie von Cunningham et al. verwendet[66], eine Alternative darstellen. Die TNF α -Vorbehandlung führte lediglich zu einer TF-Oberflächenexpression auf ca. 50% der Zellen, erhöhte somit aber die Zahl der Angriffsmöglichkeiten für rFVIIa um mehr als das doppelte. Durch die nachfolgende LPS-Stimulation wurde die Expression noch zusätzlich gesteigert. Allerdings zeigte sich ausgerechnet in diesem vielversprechenden Modell kein Effekt von rFVIIa.

Unter den experimentellen Bedingungen der vorgelegten Arbeit konnte also der immunmodulatorische Effekt von rFVIIa weder mit der Komplexbildung aus TF und rFVIIa noch mit der von rFVIIa vermittelten Produktion von Thrombin in Verbindung gebracht werden. Ob der Effekt, wie angenommen, über PARs vermittelt wird, konnte mangels eines Versuches mit einem spezifischen Antagonisten bzw. Agonisten nicht geklärt werden.

Aus den Beobachtungen ergibt sich auch die Frage nach der Relevanz des Effekts für das humane System, weshalb zusätzlich zu den Versuchen mit der monozytären Zelllinie der Standardversuch mit rFVIIa-Präinkubation und anschließender LPS-Stimulation auch mit PBMCs durchgeführt wurde. Die Zytokinproduktion wurde dabei nur durchflusszytometrisch bestimmt, da hier durch Oberflächenfärbung von CD14 ausschließlich die Messung der Zytokinsynthese von Monozyten möglich ist. Dabei zeigte sich keinerlei immunmodulatorischer Einfluss von rFVIIa auf die LPS-induzierte Zytokinantwort, was den Schluss nahe legt, dass die im Standardversuchsverfahren festgestellten Effekte von rFVIIa auf die LPS-induzierte Zytokinsynthese von MonoMac6 Zellen auch Zelllinien-spezifisch sein könnten.

Auch wenn in der vorgelegten Arbeit kein direkter Zusammenhang zwischen der immunmodulatorischen Wirkung von rFVIIa und der TF-Oberflächenexpression nachgewiesen werden konnte, ist eine Verbindung dieser beiden Phänomene nicht definitiv auszuschließen. In vitro wurde die Induktion von TF durch entzündliche Stimuli bestens untersucht und in der vorgelegten Arbeit nachgewiesen.[7] In vivo ist dieses Phänomen

sehr viel schwieriger zu beobachten. Osterud und Almdahl veröffentlichten in mehreren Artikeln Fälle von erhöhter TF-Aktivität von Monozyten bei Patienten mit Meningokokken Infektionen[127], nach endoprothetischem Gelenkersatz an der Hüfte[128] und bei sekundärer bakterieller Peritonitis.[129] In der vorgelegten Arbeit wurden intensivmedizinisch-behandelte Patienten auf erhöhte TF-Oberflächenexpression auf Monozyten per FACS-Analyse untersucht sowie die TF-Aktivität dreier intensivmedizinisch behandelter Patienten mit hohem Endotoxinspiegel im Blut gemessen, darunter zwei Patienten mit postoperativen Infektionen und ein Patient mit schweren Brandverletzungen. Die FACS-Analyse führte zu keiner TF-Detektion, die TF-Aktivitätsnachweise ließen hingegen auf eine erhöhte Aktivität während einer Infektion schließen. Möglicherweise liegt TF in intrazellulären Speichern vor und ist deshalb an der Zelloberfläche nicht nachweisbar. Daraus könnte man spekulativ ableiten, dass rFVIIa in vivo möglicherweise den funktionsvermittelnden Faktor TF auf peripheren Blutzellen nicht erreicht. Weiter ist es aber auch möglich, dass TF eine Konformationsänderung, beispielsweise eine Dimerisierung durchläuft, und so eine Zunahme der Aktivität ohne eine erhöhte Expression erfolgt. Dieses Phänomen wurde für die prokoagulatorische Aktivität von TF bereits beschrieben.[7] Unter diesen Umständen könnte durch eine Interaktion von FVIIa und TF an der Zelloberfläche ein Effekt auf die Entzündungsantwort vermittelt werden. Verbrennungspatienten zeigen zwar oft einen hohen Endotoxinspiegel[130], jedoch scheint die TF-Aktivität in erster Linie bei Infektionen erhöht zu sein. Nygaard et al. konnten aber auch eine erhöhte TF-Aktivität nach operativem Trauma nachweisen.[128] Die in der vorgelegten Arbeit verwendete Fallzahl ist nicht repräsentativ, weshalb es eine interessante Fragestellung wäre, ob die Art des Traumas bei der Induktion von TF auf Monozyten eine Rolle spielt.

Im Gegensatz zu MM6 war die in-vitro Induktion von TF durch TNF α auf CD14+ Monozyten in PBMCs nicht möglich, weshalb keine Experimente mit isolierten CD14+ Monozyten mit erhöhter TF-Expression durchgeführt werden konnten. Die Induktion von TF auf isolierten, humanen Monozyten durch einen anderen Stimulus wäre möglicherweise ein interessanter Ansatz. Jedoch führen die meisten in Frage kommenden Reagenzien zu einer gleichzeitigen, zu diesem Zeitpunkt nicht gewünschten, Aktivierung der Zytokinproduktion.

Zusammenfassend ergibt sich für die Betrachtung der Vorgänge im Bezug auf klinische Aspekte, dass an PBMCs von gesunden Menschen offenbar keine immunmodulatorischen Vorgänge durch rFVIIa zu beobachten sind. Die Tatsache, dass TF bei kritisch Kranken

zwar mit erhöhter Aktivität jedoch nicht mit erhöhter Oberflächenexpression auf zirkulierenden Blutzellen nachzuweisen war, erlaubt es nicht eine mögliche Modulation der Immunreaktion durch rFVIIa völlig zurückzuweisen, auch weil in dem in der vorgelegten Arbeit verwendeten Modell das Vorhandensein von TF für die Wirkung von rFVIIa unbedeutend erscheint. Die Vorgänge in der Interaktion von Gerinnung und Entzündungsantwort und deren Modulation durch rFVIIa sind offenbar komplizierter, als in dem hier verwendeten Modell nachvollziehbar. Eventuell könnte ein Versuchsaufbau, welcher Monozyten aus Patienten mit schwerer Sepsis, die über Magnetsäulen unter Verwendung von magnetischen Beads gewonnen werden, helfen zu klären, ob unter klinischen Bedingungen ein Einfluss von rFVIIa auf die Immunfunktion besteht.

8 Zusammenfassung

Blutgerinnung und Entzündung sind zwei stark miteinander verknüpfte Vorgänge im menschlichen Körper. Es ist gängige Meinung, dass während einer Sepsis die systemische Entzündung unweigerlich zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems und einer gleichzeitigen Inhibition des blutgerinnungshemmenden Systems sowie der Fibrinolyse führt. Durch die massive Aktivierung der Gerinnung kommt es zu einer sogenannten Verbrauchskoagulopathie, bei der vor allem die antikoagulatorische Kapazität stark reduziert ist. So ist die Aktivität von ATIII und APC, zwei der wichtigsten körpereigenen Gerinnungsinhibitoren, während der Sepsis erheblich vermindert. Rekombinant hergestelltes APC hat als Xigris® seit 2002 die europäische Zulassung zur Behandlung der schweren Sepsis. In einer klinischen Studie der Phase 3 wurde eine Reduktion der 28-Tage Sterblichkeit durch die Gabe von APC bei Patienten mit schwerer Sepsis festgestellt. Im Gegensatz zu APC zeigte ATIII in einer Studie der Phase 3 an Patienten mit schwerer Sepsis keine Reduktion der 28-Tage Sterblichkeit.

Es ist generell akzeptiert, dass das septische Mehrorganversagen durch die systemische Immunantwort des Organismus auf eine Infektion und die daraus resultierende überschießende systemische Freisetzung inflammatorischer Mediatoren vermittelt wird. Die Freisetzung dieser Mediatoren erfolgt unter anderem aus Monozyten. Durch den entzündlichen Stimulus während einer Verletzung oder Sepsis wird auf Monozyten neben der Freisetzung von Zytokinen auch TF induziert, der Rezeptor und Aktivator von FVII. Der Komplex aus TF und FVIIa stellt den Anfangspunkt der exogenen Gerinnung dar. Seit einigen Jahren wird rFVIIa als „rescue therapy“ zur Kontrolle schwerer traumatisch verursachter Hämorrhagien diskutiert. Dabei soll durch die Gabe von rFVIIa die Gerinnung spezifisch am Ort der Verletzung verstärkt werden. Da durch das Trauma und die damit verbundene Entzündungsreaktion Monozyten vermutlich TF exprimieren, stellen auch diese Zellen einen potentiellen Angriffspunkt für rFVIIa dar.

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war, mögliche gerinnungsunabhängige immunmodulatorische Eigenschaften dieser, in der Intensivmedizin verwendeten, körpereigenen Substanzen zu untersuchen. Im Speziellen sollte die Auswirkung der Pro- bzw. Antikoagulantien auf die LPS-induzierte Zytokinfreisetzung von Monozyten untersucht werden, ein wichtiger Bestandteil in der Entstehung von Sepsis und MODS. Dazu wurde ein Versuchsmodell mit einer humanen, monozytären Zelllinie, MonoMac6, etabliert. Die Produktion von IL-1 β , IL-8 und TNF α wurde intrazellulär mit Hilfe der

Durchflusszytometrie bestimmt. Im Zellkulturüberstand wurden die Konzentrationen von IL-1 β , IL-8, IL-10 und TNF α mit einem Luminex-100 System gemessen. Zusätzlich wurde für rFVIIa der Einfluss auf die LPS-induzierte IL-1 β -, IL-6-, IL-8- und TNF α -Synthese von CD14+ Monozyten in PBMCs durchflusszytometrisch erfasst.

In der vorgelegten Arbeit konnte eine limitierende Wirkung von APC und ATIII auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion von Monozyten festgestellt werden. APC verminderte die IL-1 β -, IL-10- und TNF α -Ausschüttung signifikant, wobei Überstandsmessungen die eindeutigsten Ergebnisse zeigten. Der Effekt von ATIII ließ sich durchflusszytometrisch besser bestimmen, als aus dem Überstand. Es zeigte sich eine signifikant verminderte LPS-induzierte IL-1 β - und TNF α -Produktion der Monozyten. Zusätzlich wurde der Effekt von Heparin auf die ATIII-Wirkung untersucht, da es mehrere Hinweise auf eine negative Beeinflussung der ATIII-Therapie in der Sepsis durch gleichzeitige Gabe von Heparin gibt. In der vorgelegten Arbeit konnte interessanter Weise kein antagonisierender Effekt von Heparin auf die immunologische Wirkung von ATIII festgestellt werden.

Neben dem positiven Effekt durch die Wiederherstellung der Antikoagulation während der Sepsis, kann APC auch zur Wiederherstellung des Gleichgewichts zwischen Pro- und Antiinflammation beitragen. APC vermindert sowohl die Synthese pro-, als auch die antiinflammatorisch wirkender Mediatoren, was eine Erklärung für die Wirksamkeit bei dem sehr heterogenen Kollektiv der Sepsispatienten sein könnte. ATIII reduziert nach unseren Ergebnissen lediglich die Synthese der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β , nicht aber die von IL-10. Geht man davon aus, dass APC deshalb wirksam ist, weil es sowohl eine überschießende Pro- als auch Antiinflammation dämpfen kann, wäre das eine Erklärung für das Fehlen des klinischen Wirksamkeitsnachweises für ATIII bei Patienten mit schwerer Sepsis.

Für rFVIIa ergab sich ein messbarer, aber nicht eindeutig charakterisierbarer immunmodulatorischer Effekt auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion von Monozyten. Bei MonoMac6 Zellen zeigte sich ein leicht begrenzender Effekt auf die IL-8- und TNF α -Produktion. Die Behandlung von PBMCs mit rFVIIa ergab keine veränderte LPS-induzierte Zytokinfreisetzung von CD14+ Monozyten. In verschiedenen Versuchsabläufen wurden MonoMac6 Zellen zur Erhöhung der TF-Expression vor der Inkubation mit rFVIIa mit TNF α oder LPS behandelt. Dabei zeigte sich je nach Messmethode und Vorbehandlung außer einer geringen Steigerung der TNF α -Synthese LPS-vorbehandelter Monozyten kein Effekt. Zusätzlich wurde eine Transfektion der MonoMac6 Zellen mit TF durchgeführt. In Versuchen mit dieser Zelllinie ergab sich eine erhöhte TNF α -Synthese

unter rFVIIa-Einfluss. Dieses Ergebnis ist jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da die Reaktion der transfizierten Zellen auf LPS alleine im Kontrollexperiment nicht der des Wildtyps entsprach.

Eine rFVIIa-induzierte Bildung von Thrombin kann ebenfalls in die Immunreaktion eingreifen, dies illustriert die in der vorgelegten Arbeit unter Thrombineinfluss gemessene, stark verminderte LPS-induzierte IL-10 Ausschüttung. Allerdings konnte der direkte immunmodulatorische Effekt von rFVIIa weder mit der Komplexbildung aus TF und rFVIIa noch mit der von rFVIIa vermittelten Produktion von Thrombin in Verbindung gebracht werden. Die immunmodulatorische Wirkung von rFVIIa auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion von Monozyten konnte mit den in der vorgelegten Arbeit verwendeten Modellen nicht abschließend geklärt werden und lässt noch viel Raum für weitere Untersuchungen. Transfektionsversuche mit anderen monozytären Zelllinien oder die Selektion von TF-exprimierenden Immunzellen aus kritisch kranken Patienten wären mögliche Versuchsansätze für die Zukunft. Auch ein geeigneter Stimulus zur Induktion von TF auf isolierten humanen Monozyten, der nicht gleichzeitig die Zytokinsynthese anregt, würde vielversprechende Möglichkeiten bieten.

9 Summary

Coagulation and Inflammation are two intimately connected pathways in the human body. It is well-established that during sepsis, systemic inflammation leads inevitably to activation of coagulation and simultaneously to inhibition of the anticoagulant system and fibrinolysis. Due to massive activation of coagulation a so-called consumption-coagulopathy occurs, during which mainly the anticoagulant capacity is highly impaired. Hence, the activity of ATIII and APC, two of the most important anticoagulants naturally produced in the body, is strongly reduced during sepsis. Recombinant APC (Xigris®) is licensed in Europe for the treatment of severe sepsis. After administration of APC to patients with severe sepsis a reduction of 28-days mortality has been observed during a clinical phase 3 study. In contrast to APC, ATIII showed no reduction of 28-days mortality in patients with severe sepsis in a big phase 3 study.

It is generally accepted that septic multiple organ failure is mediated by the systemic host response to infection resulting in an overwhelming systemic release of inflammatory mediators. Amongst others, monocytes release these mediators. The inflammatory stimulus during trauma or sepsis induces not only release of cytokines but also triggers the expression of TF, the receptor and activator of FVII, on monocytes. The complex of TF and FVII forms the point of initiation of exogenous coagulation. For some years rFVIIa has been discussed as “rescue therapy” to control severe traumatic haemorrhage. Thereby administration of rFVIIa shall enhance coagulation specifically at the site of injury. Due to trauma and resulting inflammation monocytes probably express TF, what turns them into a potential target for rFVIIa.

Aim of this study was to analyze possible immunomodulatory characteristics of these agents independent of their coagulatory effects, that are naturally present in the human body and are widely used in critical care. In detail, the effect of these pro- and anticoagulants on the LPS-induced cytokine release of monocytes, an important part of the development of sepsis and MODS, was to be examined. Therefore, an experimental model was established using a human, monocytic cell line, MonoMac6. Production of IL-1 β , IL-8 and TNF α was defined intracellularly by flow cytometry. Concentrations of IL-1 β , IL-8, IL-10 and TNF α were measured in cell culture supernatant by a Luminex-100 system. Additionally, the effect of rFVIIa on the LPS-induced IL-1 β -, IL-6-, IL-8- und TNF α -synthesis of CD14+ PBMCs was analyzed by flow cytometry.

In these experiments, a limiting effect of APC and ATIII on the LPS-induced cytokine production of monocytes has been observed. APC decreased the IL-1 β -, IL-10- und TNF α -release significantly, thereby measurements from the supernatant provided the most distinct results. The use of flow cytometry was superior to measurements from the supernatant in order to show the effect of ATIII. A significantly reduced LPS-induced IL-1 β - and TNF α -production of monocytes was shown. Additionally, the effect of Heparin on ATIII-action was examined, as there are several references that suggest inhibition of ATIII in sepsis therapy when administrated simultaneously with Heparin. Interestingly, in this study no antagonizing effect of Heparin on the immunological action of ATIII could be seen.

Besides the positive effect by reconstitution of anticoagulation during sepsis, APC is also supposed to account for the reconstitution of the balance between pro- and antiinflammation. APC decreases either the synthesis of pro- and of antiinflammatory mediators, what might be an explanation for its efficacy in treatment of the very heterogenic group of sepsis patients. Following our results ATIII reduces only the synthesis of the proinflammatory cytokines TNF α and IL-1 β , but not of IL-10. Assuming that APC is efficient because of its ability to abate either an overwhelming pro- and antiinflammation, this could be one reason for the lack of efficacy of ATIII in clinical trials.

Results from experiments with rFVIIa showed no clearly distinguishable immunomodulatory effect on the LPS-induced cytokine production of monocytes. The IL-8- and TNF α -production of MonoMac6 cells was slightly restricted by rFVIIa. Treatment of PBMCs with rFVIIa showed no change in the LPS-induced cytokine production of CD14+ monocytes. In several different experimental settings MonoMac6 cells were treated with LPS or TNF α before incubation with rFVIIa in order to increase TF expression. Thereby, besides a slightly stimulated TNF α -synthesis of LPS-pretreated monocytes depending on testing method and pretreatment, no effect was shown. Supplementary, a transfection with TF of MonoMac6 cells was carried out. Experiments with this transfected cell line showed an increased TNF α -synthesis under influence of rFVIIa. However, this result has to be considered with caution as the reaction of transfected cells to LPS was not equivalent to the reaction of wild type cells used as control. rFVIIa-induced formation of thrombin can also affect the immunoresponse, this is illustrated by the strongly decreased LPS-induced IL-10 release under the influence of thrombin measured in this study. The immunomodulatory effect of rFVIIa on the LPS-induced cytokine production of

monocytes could not be clarified terminally with the experimental models used in this study and leaves room for further experiments. Transfection studies with different monocytic cell lines or selection of TF-expressing immune cells from critically ill patients might be potential approaches in future. Also an adequate stimulus for the induction of TF on isolated human monocytes which does not initiate the synthesis of cytokines might provide promising possibilities.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf der Immunantwort nach septischem Insult (Abbildung aus [17])	4
Abbildung 2: Ungleichgewicht des Gerinnungssystems in der Sepsis (Abbildung aus [23]) (PAI-1=Plasminogen activator inhibitor-1)	5
Abbildung 3: FVIIa als Anfangspunkt der Gerinnungskaskade (Abbildung der Firma NovoNordisk)	12
Abbildung 4: Bildliche Darstellung der Bioplexmethode (Abbildung der Firma Biorad)	31
Abbildung 5: Sättigungskurve des TNF α -PE Antikörpers	39
Abbildung 6: Anteil an Zytokin-produzierenden Zellen von MonoMac6 Zellen nach den angegebenen Inkubationszeiten mit 1000ng/ml LPS (n=1)	40
Abbildung 7: Zytokinsynthese von MonoMac6 Zellen nach den angegebenen Inkubationszeiten mit 200 bzw. 1000ng/ml LPS, ausgedrückt als mittlere Fluoreszenzaktivität (n=3)	41
Abbildung 8: Anteil an Zytokin produzierenden Zellen der CD14+ PBMCs nach den angegebenen Inkubationszeiten mit 200 bzw. 1000ng/ml LPS (n=1)	42
Abbildung 9: Zytokinproduktion von CD14+ PBMCs nach den angegebenen Inkubationszeiten mit 200 bzw. 1000ng/ml LPS, ausgedrückt als mittlere Fluoreszenzaktivität (n=1)	42
Abbildung 10: Vergleich der Zytokinproduktion über Nacht FCS-ausgehungerter MonoMac6 Zellen mit der herkömmlich kultivierter MonoMac6 Zellen nach vierstündiger Inkubation mit 1000ng/ml LPS (n=1)	43
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von APC (μ g/ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen in serumhaltigem Medium (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; p<0,05; ANOVA, n=3)	46
Abbildung 12: Bioplex-Bestimmung des Einflusses von APC (μ g/ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen in serumhaltigem Medium (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; p<0,05; ANOVA, n=3)	48
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von APC (μ g/ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen in serumfreiem Medium (+LPS=1000ng/ml) (n=3)	50
Abbildung 14: Bioplex Bestimmung des Einflusses von APC (μ g/ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen in serumfreiem Medium (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; p<0,05; ANOVA, n=3)	52
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von ATIII (I.E./ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; p<0,05; ANOVA, n=3)	55
Abbildung 16: Bioplex Bestimmung des Einflusses von ATIII (I.E./ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; p<0,05; ANOVA, n=3, bei +LPS und +20AT+LPS n=9)	57
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von Heparin (I.E./ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; p<0,05; ANOVA, n=3)	59
Abbildung 18: Bioplex Bestimmung des Einflusses von Heparin (I.E./ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; p<0,05; ANOVA; n=3 für Werte ohne LPS, n=6 für Werte mit LPS)	62
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von ATIII (20I.E./ml) und Heparin (I.E./ml) in Kombination auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; p<0,05; t-Test; n=3) (ANOVA mit +LPS+AT als Kontrollgruppe; p<0,05; n=3)	64
Abbildung 20: Bioplex Bestimmung des Einflusses von ATIII (20I.E./ml) und Heparin (I.E./ml) in Kombination auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; p<0,05; t-Test; n=9) (ANOVA mit +AT20+LPS als Kontrollgruppe; p<0,05; n=6 für Werte mit Heparin, n=9 für Werte ohne Heparin)	66
Abbildung 21: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von rFVIIa (μ g/ml) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; p<0,05; ANOVA, n=3)	69

Abbildung 22: Bioplex Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=1000ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p<0,05$; ANOVA, $n=3$)	71
Abbildung 23: Oberflächenexpression von TF auf MonoMac6 Zellen nach der jeweiligen Inkubationszeit in Stunden mit den angegebenen Stimuli ($n=1$)	72
Abbildung 24: Oberflächenexpression von TF auf CD14+ PBMCs von einem gesunden Probanden nach der jeweiligen Inkubationszeit mit 200ng/ml LPS oder 100ng/ml TNF α .	73
Abbildung 25: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen nach LPS Präinkubation (+LPS=200ng/ml) (ANOVA mit +LPS als Kontrollgruppe; $p<0,05$; $n=3$)	76
Abbildung 26: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen nach TNF α Vorbehandlung (+TNF=100ng/ml; +LPS=200ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p<0,05$, t-Test, $n=3$) (ANOVA mit +TNF+LPS als Kontrollgruppe; $p<0,05$; $n=3$)	78
Abbildung 27: Bioplex Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen nach TNF α Vorbehandlung (+TNF=100ng/ml; +LPS=200ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p<0,05$; t-Test, $n=3$) (ANOVA mit +TNF+LPS als Kontrollgruppe; $p<0,05$; $n=3$)	81
Abbildung 28: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen nach LPS Vorbehandlung (+LPS=200ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p<0,05$; ANOVA, $n=3$)	83
Abbildung 29: Ergebnis des Western Blots; U=unbehandelte MonoMac6 Zellen, T=transfizierte Zellen, L=LPS-stimulierte Zellen	84
Abbildung 30: Vergleich der TF-Aktivität von unstimulierten und LPS-stimulierten MonoMac6 (MM6) Zellen, sowie der TF-transfizierten Zellen (+LPS=200ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu MM6-LPS; $p<0,05$; ANOVA, $n=3$)	84
Abbildung 31: Vergleich der Zytokinproduktion von MonoMac6 Zellen, der TF-transfizierten Zelllinie und der transfizierten Kontrollzelllinie G418 ohne LPS-Stimulation bzw. nach Stimulation mit 200 oder 1000ng/ml LPS (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) (*statistisch signifikanter Unterschied zu nicht transfizierten MonoMac6 Zellen; $p<0,05$; ANOVA, $n=3$)	86
Abbildung 32: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von TF-transfizierten MonoMac6 Zellen (+LPS=200ng/ml) (ANOVA mit +LPS als Kontrollgruppe; $p<0,05$; $n=3$)	88
Abbildung 33: Bioplex Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von TF-transfizierten MonoMac6 Zellen (+LPS=200ng/ml) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p<0,05$; ANOVA, $n=3$)	90
Abbildung 34: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von Thrombin (nM) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=200ng/ml LPS) (ANOVA mit +LPS als Kontrollgruppe; $p<0,05$; $n=3$)	92
Abbildung 35: Bioplex Bestimmung des Einflusses von Thrombin (nM) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-8; C: IL-10; D: TNF α) von MonoMac6 Zellen (+LPS=200ng/ml LPS) (*statistisch signifikanter Unterschied zu +LPS; $p<0,05$; ANOVA, $n=3$)	94
Abbildung 36: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von rFVIIa ($\mu\text{g/ml}$) auf die Zytokinproduktion (A: IL-1 β ; B: IL-6; C: IL-8; D: TNF α) von CD14+ PBMCs gesunder Probanden (+LPS=200ng/ml) (ANOVA mit +LPS als Kontrollgruppe; $p<0,05$; $n=3$)	98

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definition des SIRS.....	3
Tabelle 2: Prozentsatz toter nicht-transfizierter MonoMac6 Zellen nach zwei Passagen mit der angegebenen Zeocin Konzentration	33
Tabelle 3: Anteil toter Zellen in der transfizierten und der nicht-transfizierten Kontrollpopulation während der Selektionsphase der G418-Zelllinie mit Geneticin.....	34
Tabelle 4: Anteil toter Zellen in der transfizierten und nicht-transfizierten Kontrollpopulation während der Selektionsphase der TF-transfizierten-Zelllinie mit Zeocin	34
Tabelle 5: Thrombinaktivität verschiedener Reagenzien und Versuchsüberstände dargestellt als Gesamtaktivität und als Hirudin-hemmbar, also tatsächlich durch Thrombin verursachte Aktivität (Versuche unter Zugabe von rFVIIa grau unterlegt) (Vermutlich nötige Konzentration um PAR-1 zu aktivieren: 1000pM (Erfahrungswerte Prof. Sommerhoff)) (n=1)	95
Tabelle 6: Patientendaten und TF-Aktivitätswerte von 25.000 isolierten Monozyten	99

12 Literaturverzeichnis

1. Sherwood, E.R. and T. Toliver-Kinsky, *Mechanisms of the inflammatory response*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2004. **18**(3): p. 385-405.
2. Opal, S.M. and C.T. Esmon, *Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis*. Crit Care, 2003. **7**(1): p. 23-38.
3. Corrigan, J.J., Jr., W.L. Ray, and N. May, *Changes in the blood coagulation system associated with septicemia*. N Engl J Med, 1968. **279**(16): p. 851-6.
4. Schouten, M., et al., *Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(3): p. 536-45.
5. Machado, F.R. and E. Silva, *Coagulation and sepsis*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2006. **6**(2): p. 175-82.
6. Esmon, C.T., *The interactions between inflammation and coagulation*. Br J Haematol, 2005. **131**(4): p. 417-30.
7. Chu, A.J., *Tissue factor upregulation drives a thrombosis-inflammation circuit in relation to cardiovascular complications*. Cell Biochem Funct, 2006. **24**(2): p. 173-92.
8. Levi, M., T. van der Poll, and H.R. Buller, *Bidirectional relation between inflammation and coagulation*. Circulation, 2004. **109**(22): p. 2698-704.
9. de Jonge, E., et al., *Activation of coagulation by administration of recombinant factor VIIa elicits interleukin 6 (IL-6) and IL-8 release in healthy human subjects*. Clin Diagn Lab Immunol, 2003. **10**(3): p. 495-7.
10. Rees, D.D., et al., *Nitric oxide and the haemodynamic profile of endotoxin shock in the conscious mouse*. Br J Pharmacol, 1998. **124**(3): p. 540-6.
11. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl, *The pathophysiology and treatment of sepsis*. N Engl J Med, 2003. **348**(2): p. 138-50.
12. Bone, R.C., W.J. Sibbald, and C.L. Sprung, *The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure*. Chest, 1992. **101**(6): p. 1481-3.
13. Reinhart, K., et al., *[Diagnosis and therapy of sepsis: guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine]*. Anaesthesist, 2006. **55 Suppl 1**: p. 43-56.
14. E. Faist, H.T., *The Immune Response*, in *Trauma*, K.L.M. D. V. Feliciano, E. E. Moore, Editor. 2007, McGraw-Hill Companies. p. 1345-1357.
15. Jansen, M.J., et al., *Inflammatory cytokines in an experimental model for the multiple organ dysfunction syndrome*. Crit Care Med, 1996. **24**(7): p. 1196-202.
16. Nathens, A.B. and J.C. Marshall, *Sepsis, SIRS, and MODS: what's in a name?* World J Surg, 1996. **20**(4): p. 386-91.
17. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L.L. Moldawer, *Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity*. Shock, 2001. **16**(2): p. 83-96.
18. Bone, R.C., *Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation*. Crit Care Med, 1996. **24**(1): p. 163-72.
19. Neidhardt, R., et al., *Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients*. J Trauma, 1997. **42**(5): p. 863-70; discussion 870-1.

20. Osuchowski, M.F., et al., *Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1967-74.
21. van der Poll, T., et al., *Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects*. N Engl J Med, 1990. **322**(23): p. 1622-7.
22. van der Poll, T., et al., *Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1253-9.
23. Zeerleder, S., C.E. Hack, and W.A. Willemin, *Disseminated intravascular coagulation in sepsis*. Chest, 2005. **128**(4): p. 2864-75.
24. Wilson, R.F., et al., *Sepsis and antithrombin III, prekallikrein, and fibronectin levels in surgical patients*. Am Surg, 1989. **55**(7): p. 450-6.
25. Brandtzaeg, P., et al., *The quantitative association of plasma endotoxin, antithrombin, protein C, extrinsic pathway inhibitor and fibrinopeptide A in systemic meningococcal disease*. Thromb Res, 1989. **55**(4): p. 459-70.
26. Bernard, G.R., et al., *Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis*. N Engl J Med, 2001. **344**(10): p. 699-709.
27. Mann, H.J., M.A. Short, and D.E. Schlichting, *Protein C in critical illness*. Am J Health Syst Pharm, 2009. **66**(12): p. 1089-96.
28. Neyrinck, A.P., et al., *Protective mechanisms of activated protein C in severe inflammatory disorders*. Br J Pharmacol, 2009.
29. Taylor, F.B., Jr., et al., *Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon*. J Clin Invest, 1987. **79**(3): p. 918-25.
30. Esmon, C.T., *The protein C pathway*. Chest, 2003. **124**(3 Suppl): p. 26S-32S.
31. Derhaschnig, U., et al., *Recombinant human activated protein C (rhAPC; drotrecogin alfa [activated]) has minimal effect on markers of coagulation, fibrinolysis, and inflammation in acute human endotoxemia*. Blood, 2003. **102**(6): p. 2093-8.
32. Kerschen, E.J., et al., *Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C*. J Exp Med, 2007. **204**(10): p. 2439-48.
33. Mosnier, L.O., B.V. Zlokovic, and J.H. Griffin, *The cytoprotective protein C pathway*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3161-72.
34. Nick, J.A., et al., *Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis*. Blood, 2004. **104**(13): p. 3878-85.
35. Yuksel, M., et al., *Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in human monocytes*. Thromb Haemost, 2002. **88**(2): p. 267-73.
36. Stephenson, D.A., et al., *Modulation of monocyte function by activated protein C, a natural anticoagulant*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2115-22.
37. Czeslick, E.G., et al., *Drotrecogin alfa (activated) does not affect intracellular production of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in endotoxin-stimulated human monocytes*. Anesth Analg, 2005. **101**(6): p. 1805-8.
38. Warren, B.L., et al., *Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial*. Jama, 2001. **286**(15): p. 1869-78.
39. Taylor, F.B., Jr., et al., *Antithrombin-III prevents the lethal effects of Escherichia coli infusion in baboons*. Circ Shock, 1988. **26**(3): p. 227-35.

40. Dickneite, G. and B. Leithauser, *Influence of antithrombin III on coagulation and inflammation in porcine septic shock*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(6): p. 1566-72.
41. Dickneite, G. and E.P. Paques, *Reduction of mortality with antithrombin III in septicemic rats: a study of Klebsiella pneumoniae induced sepsis*. Thromb Haemost, 1993. **69**(2): p. 98-102.
42. Minnema, M.C., et al., *Recombinant human antithrombin III improves survival and attenuates inflammatory responses in baboons lethally challenged with Escherichia coli*. Blood, 2000. **95**(4): p. 1117-23.
43. Blauhut, B., et al., *Substitution of antithrombin III in shock and DIC: a randomized study*. Thromb Res, 1985. **39**(1): p. 81-9.
44. Fourrier, F., et al., *Double-blind, placebo-controlled trial of antithrombin III concentrates in septic shock with disseminated intravascular coagulation*. Chest, 1993. **104**(3): p. 882-8.
45. Inthorn, D., et al., *Antithrombin III supplementation in severe sepsis: beneficial effects on organ dysfunction*. Shock, 1997. **8**(5): p. 328-34.
46. Wiedermann, C.J., et al., *High-dose antithrombin III in the treatment of severe sepsis in patients with a high risk of death: efficacy and safety*. Crit Care Med, 2006. **34**(2): p. 285-92.
47. Roemisch, J., et al., *Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2002. **13**(8): p. 657-70.
48. Nevieri, R., et al., *Antithrombin reduces mesenteric venular leukocyte interactions and small intestine injury in endotoxemic rats*. Shock, 2001. **15**(3): p. 220-5.
49. Ostrovsky, L., et al., *Antithrombin III prevents and rapidly reverses leukocyte recruitment in ischemia/reperfusion*. Circulation, 1997. **96**(7): p. 2302-10.
50. Hoffmann, J.N., et al., *Antithrombin reduces leukocyte adhesion during chronic endotoxemia by modulation of the cyclooxygenase pathway*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(1): p. C98-C107.
51. Souter, P.J., et al., *Antithrombin inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor and interleukin-6 production by mononuclear cells, human umbilical vein endothelial cells, and whole blood*. Crit Care Med, 2001. **29**(1): p. 134-9.
52. Oelschlager, C., et al., *Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4015-20.
53. Totzke, G., et al., *Effects of antithrombin III on tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synthesis in vascular smooth muscle cells*. J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(12): p. 1063-9.
54. Mohr, A.M., et al., *Recombinant activated factor VIIa and hemostasis in critical care: a focus on trauma*. Crit Care, 2005. **9 Suppl 5**: p. S37-42.
55. Fishman, P.E., et al., *Recombinant activated factor VII use in the emergency department*. Emerg Med J, 2008. **25**(10): p. 625-30.
56. Boffard, K.D., et al., *Recombinant factor VIIa as adjunctive therapy for bleeding control in severely injured trauma patients: two parallel randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trials*. J Trauma, 2005. **59**(1): p. 8-15; discussion 15-8.
57. Rizoli, S.B. and T. Chughtai, *The emerging role of recombinant activated Factor VII (rFVIIa) in the treatment of blunt traumatic haemorrhage*. Expert Opin Biol Ther, 2006. **6**(1): p. 73-81.
58. Fox, C.J., et al., *Effect of recombinant factor VIIa as an adjunctive therapy in damage control for wartime vascular injuries: a case control study*. J Trauma, 2009. **66**(4 Suppl): p. S112-9.

59. Dutton, R., et al., *Scientific and logistical challenges in designing the CONTROL trial: recombinant factor VIIa in severe trauma patients with refractory bleeding*. Clin Trials, 2009. **6**(5): p. 467-79.
60. Bouillon, B. *Update and Critical Appraisal of Recombinant Factor VIIa in Trauma*. in *8th World Congress on Trauma, Inflammation and Sepsis - TSIS 2010*. 2010. Munich.
61. Hoffman, M. and S.T. Cooper, *Thrombin enhances monocyte secretion of tumor necrosis factor and interleukin-1 beta by two distinct mechanisms*. Blood Cells Mol Dis, 1995. **21**(2): p. 156-67.
62. Naldini, A., et al., *Thrombin enhancement of interleukin-1 expression in mononuclear cells: involvement of proteinase-activated receptor-1*. Cytokine, 2002. **20**(5): p. 191-9.
63. Naldini, A., et al., *Thrombin-mediated IL-10 up-regulation involves protease-activated receptor (PAR)-1 expression in human mononuclear leukocytes*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(3): p. 736-44.
64. Naldini, A., et al., *Thrombin receptor expression and responsiveness of human monocytic cells to thrombin is linked to interferon-induced cellular differentiation*. J Cell Physiol, 1998. **177**(1): p. 76-84.
65. Muth, H., et al., *Differential gene expression in activated monocyte-derived macrophages following binding of factor VIIa to tissue factor*. Thromb Haemost, 2005. **94**(5): p. 1028-34.
66. Cunningham, M.A., et al., *Tissue factor and factor VIIa receptor/ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages*. Blood, 1999. **94**(10): p. 3413-20.
67. Rao, L.V. and U.R. Pendurthi, *Tissue factor-factor VIIa signaling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(1): p. 47-56.
68. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M., *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. 8. ed. 2001, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
69. Kaneider, N.C., et al., *Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 1): p. 227-36.
70. Bae, J.S., L. Yang, and A.R. Rezaie, *Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(8): p. 2867-72.
71. Bone, R.C., *Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome)*. Jama, 1992. **268**(24): p. 3452-5.
72. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-51.
73. Beutler, B. and E.T. Rietschel, *Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 169-76.
74. Löffler, G., Petrides, P., Heinrich, P., *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. ed. 2007, Heidelberg: Springer Verlag.
75. Dinarello, C.A., *Blocking IL-1 in systemic inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(9): p. 1355-9.
76. Opal, S.M. and V.A. DePalo, *Anti-inflammatory cytokines*. Chest, 2000. **117**(4): p. 1162-72.
77. Lin, E., S.E. Calvano, and S.F. Lowry, *Inflammatory cytokines and cell response in surgery*. Surgery, 2000. **127**(2): p. 117-26.

78. Baggiolini, M., A. Walz, and S.L. Kunkel, *Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils*. J Clin Invest, 1989. **84**(4): p. 1045-9.
79. Grutz, G., *New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(1): p. 3-15.
80. Pestka, S., et al., *Interleukin-10 and related cytokines and receptors*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 929-79.
81. Del Vecchio, M., et al., *Interleukin-12: biological properties and clinical application*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(16): p. 4677-85.
82. Janeway, C.A., *Immunologie*. 5 ed. 2002: Spektrum Verlag.
83. Rahman, M.M. and G. McFadden, *Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens*. PLoS Pathog, 2006. **2**(2): p. e4.
84. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
85. Vincent, J.L., *Endpoints in sepsis trials: more than just 28-day mortality?* Crit Care Med, 2004. **32**(5 Suppl): p. S209-13.
86. Dellinger, R.P., *Cardiovascular management of septic shock*. Crit Care Med, 2003. **31**(3): p. 946-55.
87. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes*. Int J Cancer, 1988. **41**(3): p. 456-61.
88. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *In vitro desensitization to lipopolysaccharide suppresses tumour necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in a similar fashion*. Immunology, 1992. **75**(2): p. 264-8.
89. 2.6.14. Prüfung auf Bakterienendotoxine, in *Europäisches Arzneibuch*. 2005, Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart.
90. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
91. Schmidt-Supprian, M., et al., *Activated protein C inhibits tumor necrosis factor and macrophage migration inhibitory factor production in monocytes*. Eur Cytokine Netw, 2000. **11**(3): p. 407-13.
92. Esmon, C.T., *Crosstalk between inflammation and thrombosis*. Maturitas, 2004. **47**(4): p. 305-14.
93. Trentzsch, H., Burggraf, M., Zedler, S., Hoffmann, J., Faist, E. *Aktiviertes Protein C und Antithrombin III als Modulatoren der LPS-induzierten Zytokinfreisetzung aus humanen PBMC's von gesunden Probanden und von Patienten nach chirurgischem Trauma*. in *71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 93. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, 48. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie*. 2007. Berlin: German Medical Science GMS Publishing House.
94. Bae, J.S., et al., *The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells*. Blood, 2007. **110**(12): p. 3909-16.
95. Bae, J.S. and A.R. Rezaie, *Thrombin inhibits nuclear factor kappaB and RhoA pathways in cytokine-stimulated vascular endothelial cells when EPCR is occupied by protein C*. Thromb Haemost, 2009. **101**(3): p. 513-20.
96. Grey, S.T., et al., *Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester*. J Immunol, 1994. **153**(8): p. 3664-72.

97. Toltl, L.J., S. Beaudin, and P.C. Liaw, *Activated protein C up-regulates IL-10 and inhibits tissue factor in blood monocytes*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 2165-73.
98. Esmon, C.T., *Interactions between the innate immune and blood coagulation systems*. Trends Immunol, 2004. **25**(10): p. 536-42.
99. Baudo, F., et al., *Antithrombin III (ATIII) replacement therapy in patients with sepsis and/or postsurgical complications: a controlled double-blind, randomized, multicenter study*. Intensive Care Med, 1998. **24**(4): p. 336-42.
100. Eisele, B., et al., *Antithrombin III in patients with severe sepsis. A randomized, placebo-controlled, double-blind multicenter trial plus a meta-analysis on all randomized, placebo-controlled, double-blind trials with antithrombin III in severe sepsis*. Intensive Care Med, 1998. **24**(7): p. 663-72.
101. Iampietro R, S.P., Römisch J, Poole S, Gray E., *Antithrombin inhibits in vitro lipopolysaccharide induced interleukin-6 production by suppression of mRNA*. Intensive Care Med, 2000. **26**(suppl 3): p. S302.
102. Iampietro R, R.J., Poole S. et al. *Antithrombin inhibits in vitro lipopolysaccharide induced interleukin-6 and interleukin-8 production by suppression of mRNA*. in *International Congress of Thrombosis and Hemostasis*. 2001. Paris.
103. Hoffmann, J.N., et al., *Benefit/risk profile of high-dose antithrombin in patients with severe sepsis treated with and without concomitant heparin*. Thromb Haemost, 2006. **95**(5): p. 850-6.
104. Opal, S.M., et al., *Antithrombin, heparin, and heparan sulfate*. Crit Care Med, 2002. **30**(5 Suppl): p. S325-31.
105. Justus, A.C., et al., *Antithrombin binding by human umbilical vein endothelial cells: effects of exogenous heparin*. Thromb Res, 1995. **79**(2): p. 175-86.
106. Pulletz, S., et al., *Influence of heparin and hirudin on endothelial binding of antithrombin in experimental thrombinemia*. Crit Care Med, 2000. **28**(8): p. 2881-6.
107. Horie, S., H. Ishii, and M. Kazama, *Heparin-like glycosaminoglycan is a receptor for antithrombin III-dependent but not for thrombin-dependent prostacyclin production in human endothelial cells*. Thromb Res, 1990. **59**(6): p. 895-904.
108. Hoffmann, J.N., et al., *Adverse effect of heparin on antithrombin action during endotoxemia: microhemodynamic and cellular mechanisms*. Thromb Haemost, 2002. **88**(2): p. 242-52.
109. Desai, U.R., et al., *Mechanism of heparin activation of antithrombin. Role of individual residues of the pentasaccharide activating sequence in the recognition of native and activated states of antithrombin*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7478-87.
110. Heinzelmann, M., et al., *Heparin and enoxaparin enhance endotoxin-induced tumor necrosis factor-alpha production in human monocytes*. Ann Surg, 1999. **229**(4): p. 542-50.
111. Heinzelmann, M. and H. Bosshart, *Heparin binds to lipopolysaccharide (LPS)-binding protein, facilitates the transfer of LPS to CD14, and enhances LPS-induced activation of peripheral blood monocytes*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 2280-7.
112. Hochart, H., et al., *Low-molecular weight and unfractionated heparins induce a downregulation of inflammation: decreased levels of proinflammatory cytokines and nuclear factor-kappaB in LPS-stimulated human monocytes*. Br J Haematol, 2006. **133**(1): p. 62-7.
113. Hochart, H., et al., *Concentration-dependent roles for heparin in modifying lipopolysaccharide-induced activation of mononuclear cells in whole blood*. Thromb Haemost, 2008. **99**(3): p. 570-5.

114. Anastase-Ravion, S., et al., *Heparin inhibits lipopolysaccharide (LPS) binding to leukocytes and LPS-induced cytokine production*. J Biomed Mater Res A, 2003. **66**(2): p. 376-84.
115. Mandal, S.K., U.R. Pendurthi, and L.V. Rao, *Cellular localization and trafficking of tissue factor*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4746-53.
116. Hjortoe, G.M., et al., *Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration*. Blood, 2004. **103**(8): p. 3029-37.
117. Wang, X., E. Gjernes, and H. Prydz, *Factor VIIa induces tissue factor-dependent up-regulation of interleukin-8 in a human keratinocyte line*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23620-6.
118. Taylor, F.B., Jr., et al., *Lethal E. coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody*. Circ Shock, 1991. **33**(3): p. 127-34.
119. Chu, A.J., *Tissue factor mediates inflammation*. Arch Biochem Biophys, 2005. **440**(2): p. 123-32.
120. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
121. Camerer, E., W. Huang, and S.R. Coughlin, *Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5255-60.
122. Strukova, S.M., *Role of platelets and serine proteinases in coupling of blood coagulation and inflammation*. Biochemistry (Mosc), 2004. **69**(10): p. 1067-81.
123. Johnson, K., et al., *Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 5130-5.
124. Suk, K. and S. Cha, *Thrombin-induced interleukin-8 production and its regulation by interferon-gamma and prostaglandin E2 in human monocytic U937 cells*. Immunol Lett, 1999. **67**(3): p. 223-7.
125. Bae, J.S. and A.R. Rezaie, *Protease activated receptor 1 (PAR-1) activation by thrombin is protective in human pulmonary artery endothelial cells if endothelial protein C receptor is occupied by its natural ligand*. Thromb Haemost, 2008. **100**(1): p. 101-9.
126. Bae, J.S., et al., *Concentration dependent dual effect of thrombin in endothelial cells via Par-1 and Pi3 Kinase*. J Cell Physiol, 2009. **219**(3): p. 744-51.
127. Osterud, B. and T. Flaegstad, *Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavourable prognosis*. Thromb Haemost, 1983. **49**(1): p. 5-7.
128. Nygaard, O.P., et al., *Thromboplastin activity of blood monocytes after total hip replacement*. Scand J Clin Lab Invest, 1990. **50**(2): p. 183-6.
129. Almdahl, S.M., J.H. Brox, and B. Osterud, *Mononuclear phagocyte thromboplastin and endotoxin in patients with secondary bacterial peritonitis*. Scand J Gastroenterol, 1987. **22**(8): p. 914-8.
130. Moegele, C., Zedler, S., Trentzsch, H., Zwerenz, P., Eder, M., Faist, E., *Differential patterns of endotoxemia and lipopolysaccharide-binding protein concentrations in patients suffering from blunt trauma versus severe burn injury*. Inflammation Research, 2010. **59**(Suppl 1, A 426): p. S166.

13 Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	analysis of variance
APC	aktiviertes Protein C
ARDS	acute respiratory distress syndrome
ATIII	Antithrombin III
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CD	cluster of differentiation
cDNA	complimentary DNA
CO ₂	Kohlendioxid
CSIF	Zytokinsynthese inhibierender Faktor
CXCL	CXC-Motiv Chemokin
CXCR1/2	CXC-Motiv Chemokinrezeptor 1 oder 2
Da	Dalton
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAA	Endotoxin activity assay
ECL	Elektrochemolumineszenz
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPCR	endothelialer Protein C Rezeptor
E.U.	Endotoxin Units
FVII	Faktor VII
FVIIa	aktivierter Faktor VII
rFVIIa	rekombinanter, aktivierte Fraktor VII
FACS	fluorescence activated cellsorting
FITC	Fluoresceinisoithiocyanat
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
GAG	Glycosaminoglykan
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunden
HBSS	Hank`s buffered salt solution
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
I.E.	Internationale Einheiten
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-1Ra	IL-1 Rezeptor Antagonist
KG	Körpergewicht
l	Liter
LBP	LPS-Bindungsprotein
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
Min.	Minuten

mRNA	messenger RNA
MARS	mixed anti-inflammatory response syndrome
M-CSF	Monozyten Kolonie stimulierender Faktor
MHC	major histocompatibility complex
MM6	MonMac6
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natronlauge
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannt
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAMP's	Pathogen-assoziierte molekulare Mustern
PAR	Protease aktivierter Rezeptor
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PBS/ NaN ₃	PBS mit 0,1% NaN ₃
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PE-Cy 5	Phycoerythrin-Cyan5
PROWESS	Recombinant human activated protein C worldwide evaluation on severe sepsis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rFVIIa	rekombinanter, aktivierter Faktor VII
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SSC	Side Scatter
TF	tissue factor (deutsch: Gewebethromboplastin)
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TLR	toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
TTBS	Tris-Tween gepufferte Saline
u.U.	unter Umständen
z.B.	zum Beispiel

14 Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank geht vor allem an meinen Doktorvater Prof. E.Faist, der es mir ermöglichte, dieses höchst interessante Thema zu bearbeiten.

Ganz besonders großer Dank gilt meinen Betreuern Dr. S. Zedler und Dr. H. Trentzsch, die mich mit ihrem Fachwissen, ihrer konstruktiven Kritik und ihren vielen Ideen immer wieder neu motiviert haben. Sie haben mir in fachspezifischen und auch privaten Gesprächen viel Freude am wissenschaftlichen Arbeiten vermittelt.

Besonders Dr. S.Zedler trug mit seiner Einführung in die einzelnen Arbeiten im Labor und seiner Hilfe bei allen Arten von methodischen Problemen maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit bei. Dr. H. Trentzsch danke ich ganz herzlich für die Hilfe bei statistischen und klinischen Fragen.

Dr. P. Camaj aus der Klinischen Forschung Chirurgie des Klinikums Großhadern möchte ich einen herzlichen Dank für die professionelle Durchführung der Transfektion der MonoMac6 Zellen und die geduldige Erklärung bezüglich der verwendeten Methoden aussprechen.

Bei Prof. Sommerhoff und seinem Team aus der Abteilung für klinische Chemie und klinische Biochemie des Klinikums der LMU in der Innenstadt möchte ich mich herzlich für die Durchführung der Thrombinaktivitätsbestimmung und für viele hilfreiche Ideen zur Problembehebung bedanken.

Frau Dr. M. Frankenberger vom Institut für Lungenbiologie des Helmholtz Zentrums München danke ich für das Zurverfügungstellen der MonoMac6 Zellen. Ein besonderer Dank gilt ihr auch für die Tipps zur Kultivierung der Zellen und die Hilfe bei der Überwindung mancher Anfangsschwierigkeiten.

Auch meinen Laborkollegen Carolin Mögele, Florian Heeg, Sibylle Conradi, Wolfgang Reuschl und Florian Schilhagl möchte ich einen herzlichen Dank aussprechen. Nicht nur für die gute Gesellschaft im Labor, sondern auch für die Hilfe bei der Auswahl von Patienten für die TF-Aktivitätsmessungen.

Meiner Familie danke ich für die seelische Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit, meiner Schwester besonders für das Korrekturlesen, meinem Bruder für die schnelle Hilfe bei allen Computerproblemen.

Diese Studie wurde unterstützt von der Firma Novo Nordisk durch die kostenlose Bereitstellung von Eptacoq alfa (NOVOSEVEN®).

